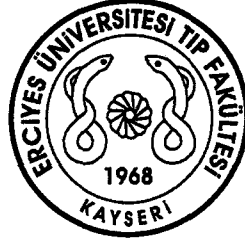


163466



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

STREPTOZOTOSİN DİYABETİ OLUŞTURULAN RATLARDA
PROTEİN OKSİDASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. MELTEM DEMİR

Danışman

Prof. Dr. KADER KÖSE

KAYSERİ 2005

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
DİYABETES MELLİTUS	5
DENEYSEL DİYABET MODELLERİ.....	7
STREPTOZOTOSİN	8
DİYABETİK KOMPLİKASYONLARIN PATOGENEZİ.....	11
OKSİDATİF STRES.....	12
KARBONİL STRES	14
TİYOL STRES.....	18
METİLGİOKSAL.....	18
MELATONİN.....	20
GEREÇ VE YÖNTEM	24
BULGULAR.....	37
TARTIŞMA.....	47
SONUÇLAR.....	57
KAYNAKLAR.....	59
EKLER.....	67
TEZ ONAY SAYFASI.....	69

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda hazırlamış olduğum Tıpta Uzmanlık Tezi'min tüm aşamalarında ve uzmanlık eğitimim süresince bilgi, beceri ve yardımlarını esirgemeyen, kendisinden her anlamda çok şey öğrendiğim, gerçek bir bilim insanı olan, tez danışmanım Sn. Prof. Dr. S. Kader Köse hocama ve Yrd. Doç. Dr. Cevat Yazıcı hocama çok teşekkür ederim. Deneysel çalışma sürecinde gerekli olan materyalleri sağlamadaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Fahri Bayram ve Doç. Dr. Mustafa Çetin'e, DEKAM'daki çalışmalarım esnasında yardımlarından dolayı Sn. Erkut Somuk'a, Biyokimya ABD'da araştırma görevlisi olarak çalışan bütün arkadaşlarıma ve özellikle çevirilerimdeki yardımları için Dr. Sibel Deveci'ye, Tıpta Uzmanlık Eğitimi ve tez hazırlama dönemimde bizlerden uzakta olsa bile, her türlü desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Dr. A. Levent Demir'e, iş temposundan dolayı zaman zaman ihmal etmiş olsam da çok sevgili çocuklarım; oğlum Kubilay'a, kızım Begüm'e ve son olarak da Kayseri'de bulunduğum süre boyunca bana her anlamda annelik yapan, yardım meleşim Sn. Olcay Gökdağ'a çok teşekkür ederim.

KISALTMALAR

A1C	:Glikozile hemoglobin
ADA	: American Diabetes Association
AGE	:Advanced glycation end-products
ALE	:Advanced lipoxidation products
APG	: Açlık plazma glukozu
3-DG	:Deoksiglukozon
DM	:Diyabetes mellitus
DNPH	:2,4-dinitrofenilhidrazin
DTNB	:Ditiyobis(nitrobenzoik asit)
EAGLE	:Either advanced glycation or lipoxidation end product
GDM	:Gestasyonel diyabetes mellitus
GLO I ve II	:Gliksalaz I ve II
GO	:Gliksal
GSH	:Redükte glutatyon
4-HNE	:Hidroksinonenal
IFG	:Bozulmuş açlık glukozu
IGT	:Bozulmuş glukoz toleransı
<i>ip</i>	:İntraperitoneal
<i>iv</i>	:İntravenöz
MDA	:Malondialdehit
MEL	:Melatonin
MGO	:Metilgliksal
NAD	:Nikotinamid dinükleotid
NO	:Nitrit oksit
NOS	:Nitrik Oksit Sentaz
OGTT	:Oral glukoz tolerans testi
PCC	:Protein karbonil bileşikleri
RCC	:Reaktif karbonil bileşikler
<i>sc</i>	:Sübkütan
SLG	:S-Laktoilglutatyon
SOR	:Serbest oksijen radikalleri
STZ	:Streptozotosin
WHO	:Dünya Sağlık Teşkilatı

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1 : Organizmadaki bazı RCC'ler ve kaynakları.....	15
Tablo 2 : Çalışma grubunu oluşturan ratların deney planı.....	25
Tablo 3 : Kontrol ratları (n: 5)'nda ölçülen parametrelerin günlere göre değerlendirilmesi.....	38
Tablo 4 : MEL grubu (n:5)'nda ölçülen parametrelerin günlere göre Değerlendirilmesi.....	38
Tablo 5 : STZ grubu (n: 5)'nda ölçülen parametrelerin günlere göre değerlendirilmesi	39
Tablo 6 : STZ-MEL grubu (n: 5)'nda ölçülen parametrelerin günlere göre değerlendirilmesi	40
Tablo 7: Çalışma gruplarına ait "0. gün" değerlerinin karşılaştırılması (n:10)	40
Tablo 8: Çalışma gruplarına ait "1. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:5).....	41
Tablo 9: Çalışma gruplarına ait "2. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:5).....	41
Tablo 10 : Çalışma gruplarına ait "3. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:5)	42
Tablo 11 : Çalışma gruplarına ait "4. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:5).....	42
Tablo 12 : Çalışma gruplarına ait "5. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:5)	43
Tablo 13: Çalışma gruplarına ait "6. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:10)	43
Tablo 14: Çalışma gruplarını oluşturan ratların plazma PCC düzeyleri.....	44
Tablo 15: Çalışma gruplarını oluşturan ratların plazma tiyol düzeyleri.....	44
Tablo 16: Çalışma gruplarına ait "6. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:10)	45
Tablo 17: Çalışma gruplarına ait "6. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:10)	45
Tablo 18: Çalışma gruplarına ait "6. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:10)	46

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa no
Şekil 1: STZ'nin etki mekanizması	10
Şekil 2: Organizmada bulunan bazı RCC örnekleri	14
Şekil 3: Organizmada MGO Oluşumu	19
Şekil 4: Melatoninin Antioksidan Özellikleri	22



ÖZET

Amaç: Bu çalışma, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan rat diyabet modeli üzerinde, diyabet komplikasyonlarından sorumlu tutulan AGE oluşumu ile oksidatif ve karbonil stresi araştırmak ve ayrıca güçlü bir antioksidan olan melatonin (MEL)'in bu mekanizmalarla etkileşimini değerlendirmek amacıyla yapıldı.

Gereç ve Yöntem: Kontrol, MEL, STZ ve STZ-MEL olmak üzere her biri on Sprague Dawley rat içeren dört çalışma grubu oluşturuldu. STZ ve STZ-MEL gruplarında, tek doz 50 mg/kg STZ ile diyabet oluşturuldu. MEL ve STZ-MEL gruplarına 42 gün boyunca her gün *ip* olarak 25 mg/kg dozunda MEL uygulandı.

Çalışma süresince ratlar her hafta tartıldı ve 0.gün ve bir hafta arayla toplanan idrar örneklerinde ve on beş günde bir alınan kan örneklerinde glukoz ölçümü yapıldı. Ayrıca, çalışma bitiminde ratlardan alınan kan örneklerinde HbA1c tayini yapıldı.

Çalışma sonunda elde edilen plazma ve karaciğer doku örneklerinde oksidatif ve karbonil stresin göstergesi olarak kabul edilen protein karbonil bileşikleri (PCC) ve tiyol düzeyleri ölçüldü. Ayrıca, doku örneklerinde AGE prekürsörlerinden olan MGO düzeyleri ile glioksalaz (GLO) detoksifikasyon sistemini oluşturan GLO I ve GLO II aktiviteleri tayin edildi.

Bulgular: STZ ve STZ-MEL gruplarında, çalışma süresince kan ve idrar glukoz düzeylerinin sürekli yüksek kaldığı, giderek daha fazla idrar çıkaran ratların haftalar içerisinde zayıfladığı belirlendi.

Çalışma tamamlandığında, STZ grubunda yüksek bulunan doku ve plazma PCC düzeylerinin, STZ-MEL grubunda MEL etkisiyle düştüğü; buna karşılık diyabetik ratlarda düşük bulunan plazma ve doku tiyol düzeylerinin MEL varlığında yükseldiği gözlemlendi. Benzer şekilde, STZ grubunda doku MGO düzeyleri yüksek ve GLO I ile GLO II aktiviteleri düşük bulunurken; STZ-MEL grubuna uygulanan MEL'in MGO düzeylerini düşürdüğü, buna karşılık enzim aktivitelerini artırdığı belirlendi.

Sonuç: STZ ile oluşturulan diyabet modelinde, yüksek PCC ve düşük tiyol düzeyleriyle yansıtıldığı gibi, diyabetik şartlarda oksidatif ve karbonil stresin olduğu belirlendi. Yüksek MGO düzeylerinin yanı sıra, GLO detoksifikasyon sisteminin baskılanmış bulunması da, diyabette AGE oluşumunun kaçınılmaz olduğunu gösterdiğinden; diyabet komplikasyonlarını, kısmen de olsa, önleyebilmek amacıyla diyabetik hastalarda MEL gibi antioksidanların kullanımı önerilebilir.

Anahtar kelimeler: Diyabet, gliksalaz, karbonil stres, melatonin, metilgliksal, oksidatif stres, protein oksidasyonu, streptozotosin.



THE EVALUATION OF PROTEIN OXIDATION IN THE RATS WHICH INDUCED BY STREPTOZOTOCIN

ABSTRACT

Aim: This study was performed to investigate AGE formation, oxidative stress and carbonyl stress which are thought to be responsible of diabetic complications, on the diabetic rat model induced by streptozotocin (STZ), and also to evaluate the interaction of melatonin (MEL), a powerful antioxidant drug, with these mechanisms.

Materials and methods: Four study groups, each of containing ten Sprague Dawley rats, were defined as control, MEL, STZ and STZ-MEL. STZ and STZ-MEL groups were made diabetic by single 50 mg/kg dose of STZ. MEL, 25mg/kg, was daily intraperitoneally administrated to MEL and STZ-MEL groups for 42 days. During the study, the rats were weighed weekly. Blood and 24 H urine samples were collected at the beginning and at the end of the study, and also once in two weeks and weekly, respectively. Glucose measurements were made in these specimens; in addition, A1C was measured in the last blood samples.

At the end of the study, protein carbonyl compounds (PCC) and thiol levels, accepted as a marker of oxidative stress and carbonyl stress, were measured both in plasma and liver tissue samples. The levels of methylglyoxal (MGO), one of the AGE precursors, and the activities of glyoxalase I (GLO I) and GLO II enzymes, members of glyoxalase detoxification system, were also determined in only tissue samples.

Results: Blood and urine glucose levels were lasting high and rats those excreting gradually more urine lost weigh during the study.

At the end of the study, both plasma and tissue PCC levels, higher in STZ group, were found to be lower by the effect of MEL in STZ-MEL group. On the other hand, the decreases in both plasma and tissue thiol levels in diabetic rats were found to be higher in the presence of MEL in STZ-MEL group. Similarly, STZ group has been shown to have higher tissue MGO levels and lower GLO I and GLO II activities; but MEL treatment suppressed high levels of MGO and increased enzyme activities in STZ-MEL group.

Conclusion: It has been shown in STZ-induced diabetic model that there is an oxidative stress and carbonyl stress in diabetic conditions, as reflected by high PCC and low thiol levels. Addition to high MGO levels, the suppression of GLO detoxification system indicates that AGE formation in diabetes is inevitable. Therefore, the usage of antioxidants such as MEL may be suggested to prevent diabetic complications, at least partly, in diabetic patients.

Key words: Carbonyl stress, diabetes, glyoxalase, melatonin, methylglyoxal, streptozotocin, oxidative stress, protein oxidation.



GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetes mellitus (DM), toplumda oldukça yaygın ve çeşitli komplikasyonlarla seyreden kronik bir hastalıktır. Diyabet komplikasyonlarının gelişiminde en önemli risk faktörü olarak kabul edilen hipergliseminin, hangi patolojik mekanizmalarla bu komplikasyonlara neden olduğu halen tartışılmaktadır (1).

Diyabet komplikasyonlarının gelişiminde, artmış karbonil stres (1), oksidatif stres (2) ve ileri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products; AGE)'nin oluşumu (3) gibi pek çok kompleks mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. Her biri farklı temellere dayanan bu mekanizmaları destekleyen çalışmaların yanı sıra; bu mekanizmaların birbiri ile örtüşebileceğini gösteren güçlü bulgular da mevcuttur (1).

DM'de, kronik bir şekilde yüksek glukoz düzeylerine maruz kalan protein, nükleotid ve lipid gibi biyomoleküllere non-enzimatik olarak sakkarit türevlerinin bağlanması, glikasyon olarak tanımlanmaktadır. Bu bağlanmaya örnek olarak hemoglobinin non-enzimatik glikasyonu ile oluşan HbA1c verilebilir. Maillard reaksiyonları olarak adlandırılan bu sürecin ilk aşamasında oluşan şeker-protein kompleksleri (Amadori ürünleri), ikinci aşamada metilglioksal (MGO), glioksal (GO) ve 3-deoksiglukozon (3-DG) gibi reaktif ara ürünler (α -oksoaldehitler)'in oluşumuna yol açmakta ve son aşamada da genel olarak AGE olarak adlandırılan pentozidin, karboksimetillizin gibi kompleks ve oldukça heterojen bileşikler oluşmaktadır. Ayrıca glikoliz, sorbitol yolu, lipid peroksidasyonu ve karbonhidratların otooksidasyonu sırasında oluşan α -oksoaldehitlerin de AGE oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir (1,3).

AGE prekürsörü olarak kabul edilen MGO, organizmada glioksalaz I (GLO I) ve GLO II'den oluşan glioksalaz sistemi ile detoksifiye edilmektedir (4). Bununla beraber, diyabetik şartlarda bu sistemin nasıl etkilendiği halen araştırılmaktadır.

AGE oluşumu, farmakolojik olarak, aminoguanidin, tenilsetam gibi bileşiklerle önlenirse de; bu ajanların pek çok istenmeyen yan etkilerinin olması, kullanımlarını sınırlamaktadır (5). Diğer taraftan serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin organizmada şekerleri oksitleyerek AGE oluşumuna neden olduğu gösterildiğinden; antioksidan özellikteki moleküllerin, hem oksidatif hem de karbonil stresi önleyerek ve hatta AGE oluşumunu da baskılayarak diyabet ve komplikasyonlarının gelişimini önleyebileceğine dair yayınlar vardır (5,6). Vitamin E, alfa-lipoik asit, dimetilsülfoksit gibi antioksidanların hiperglisemi ile indüklenen SOR ve AGE oluşumunu *in vitro* şartlarda önleyebildiği gösterilmiştir (7).

Pineal bez hormonu olan melatonin (MEL)'in endokrin fonksiyon ve sirkadiyen ritm üzerine bilinen etkilerinden başka; *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla, antioksidan aktiviteye de sahip olduğu gösterilmiştir. Hatta, antioksidanlar içerisinde MEL'in en güçlü radikal tutucu olduğu öne sürüldüğünden, MEL'e olan ilgi giderek artmakta ve MEL'in antioksidan özelliği gün geçtikçe önem kazanmaktadır (8). MEL'in AGE oluşumu üzerine etkisi henüz bilinmemekle beraber, diyabetik ratlarda oksidatif hasarı önleyebildiği ve organizmayı diyabetin olumsuz etkilerinden koruyabildiği bildirilmiştir (9,10).

Bu çalışmada, deneysel diyabet modeli üzerinde, öne sürülen komplikasyon mekanizmaları ve birbirleri ile ilişkisi araştırılacaktır. Streptozotosin diyabeti oluşturulan ratlarda oksidatif ve karbonil stresin varlığını, protein oksidasyon ürünleri ve azalmış antioksidan aktivite üzerinden gösterebilmek amacıyla, protein karbonil bileşikleri ve tiyol gibi karbonil ve oksidatif stres parametreleri tayin edilecek; AGE oluşumuna yol açan MGO düzeylerinin yanı sıra, glioksalaz detoksifikasyon sistemi ölçülecektir. Ayrıca, MEL gibi güçlü bir antioksidanın bu mekanizmalarla muhtemel etkileşimi araştırılacaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. DİYABETES MELLİTUS

Diyabetes Mellitus (DM), insülin salınımının ve/veya insülin etkisinin tam veya kısmi eksikliklerinden kaynaklanan, hiperglisemi ile seyreden kompleks ve kronik bir hastalıktır (11).

Diyabetik sendrom, pankreasın- β hücrelerinin otoimmün harabiyetinden, dokuların insüline direncine kadar, birçok patojenik yolla gelişebilir. Yetersiz salınım ve/veya azalmış doku cevabı nedeniyle, insülinin hedef dokularda istenilen etkiyi sağlayamaması; karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasında bozukluklara yol açmaktadır (11).

Tarihçe: Eski Mısırlılar döneminde, Ebers papirüslerinde “aşırı idrar yapan hastalık” (M.Ö.1500) olarak geçen DM, Çin literatüründe “idrar yoluyla şeker kaybı” (M.Ö.400) olarak yer almaktadır. “Diabetes” tanımı ilk defa Kapadokyalı Areteus tarafından yapılmış (M.S.100); İbni Sina, 1000’li yıllarda diyabetik idrarın bal tadında olması nedeniyle, hastalığı “Diabetes mellitus olarak” adlandırmıştır. Willis, 1674’te pankreasın hormon salgılayan adacıklarını tanımlamıştır (12).

DM’nin etiopatogenezine ilişkin temel bilgiler, 19. yüzyılda Bernard ve Pasteur’un glukoz metabolizmasıyla ilgili yaptıkları deneysel çalışmalarla başlamış ve 1889’da Mering ve Minkowski tarafından hastalığın pankreas ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yirminci yüzyılın başlarında pankreas ekstreleri ile yapılan çalışmalarda, Langerhans

adacıklarından salgılanan insülinin kan şekerini düşürdüğü belirlenmiştir. Nihayet 1921 yılında saflaştırılan insülinin hastalara uygulanmasıyla, diyabet ölümcül bir hastalık olmaktan çıkmış ve tedavisinde yeni bir çağ başlatılmıştır (12).

Prevalans: Dünyada 2000'li yıllarda, tüm yaş grupları dikkate alındığında, % 2.8 olarak belirlenen DM prevalansının 2030 yılında % 4.4 olması beklenmektedir (13). Amerikan toplumunda prevalansın % 6,6 olduğu tahmin edilmekte ve bu rakamın teşhis edilenlerin yarısına karşılık geldiği varsayılmaktadır (14). Türkiye'de 1997-98 yılları arasında taranan 24.788 kişide prevalans % 7.2 olarak tespit edilmiştir (15). Kayseri'de 1994 yılında 1517 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada, DM prevalansının % 6,6 olduğu bildirilmiştir (16).

Her iki cinste eşit ve siyah ırkta beyazlara göre daha yüksek olan DM prevalansı, yaş ilerledikçe artmakta ve 55 yaşın üzerindeki hastalar, tüm diyabetik olguların yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (13).

Semptomlar: Hiperglisemi semptomları arasında poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı ve bulanık görme sayılabilir (11). Bazı hastalar, akut ataklar sırasında ketoasidoz, hiperosmolar koma gibi yaşamı tehdit eden hiperglisemik epizodlar yaşayabilirler (13).

Kronik hiperglisemi ile birlikte, enfeksiyonlara yatkınlık ve özellikle çocuklarda büyüme ve gelişme geriliği gözlenebilir (11). Hastalık ilerledikçe, sinir hücreleri, göz, böbrek, kalp ve damar gibi organlarda yetmezlik ve fonksiyon bozukluğu gelişebilir (13). "*Diyabetin geç komplikasyonları*" adı altında toplanan bu semptomlar, aşağıda gösterildiği gibi sıralanabilir (11).

- Körlüğe kadar gidebilen retinopati
- Böbrek yetmezliğine yol açan nefropati
- Ayaklarda ülser oluşumu, amputasyonlar ve charkot eklemi gelişme riski taşıyan periferik nöropati
- Seksüel disfonksiyonun yanı sıra, gastrointestinal, ürogenital ve kardiyovasküler semptomlara neden olan otonomik nöropati

Bu geç komplikasyonlar nedeniyle, artmış aterosklerotik kardiyovasküler, periferik arteriyel ve serebrovasküler hastalık riski taşıyan diyabetiklerde, anormal lipoprotein metabolizması ve hipertansiyon da sık görülmektedir (11).

2.1.1. Diyabetes mellitusun sınıflandırılması

Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ve Diyabet federasyonunun birlikte oluşturduğu uzmanlar komitesi tarafından 1980 yılında yapılan sınıflamaya göre, Tip 1 (İnsülin bağımlı; IDDM) ve Tip 2 (İnsülin bağımsız; NIDDM) diyabet olmak üzere, başlıca iki diyabet formu tanımlanmış ve bu formların adlandırılmasında, sırasıyla “juvenil” ile “yetişkin” diyabet tanımları kullanılmıştır (12).

Yıllar içerisinde mevcut sınıflandırma, Amerikan Diyabet Cemiyeti (American Diabetes Association; ADA) tarafından, tedaviden çok etiyojijiyi öne çıkaracak şekilde yeniden düzenlenmiş ve “İnsülin bağımlı/bağımsız” terimleri tanımlardan çıkarılmıştır (20). ADA tarafından 2005 yılında önerilen sınıflamaya göre; DM başlıca dört büyük grup altında toplanmaktadır (11):

- I. Tip 1 diyabet (Mutlak insülin eksikliğine yol açan β hücre harabiyeti)
- II. Tip 2 diyabet (İnsülin direncinden salınım defektlerine kadar, çok faktörlü DM)
- III. Diğer spesifik tipler
- IV. Gestasyonel diyabet mellitus (GDM)

I. Tip 1 Diyabet: Çocukluk ve adolesan dönemde daha yaygın olan tip 1 DM, hemen hemen her yaş grubunda görülebilir ve tüm diyabetik olguların % 5-10'unu oluşturur. Hastalığın nedeni, mutlak insülin eksikliğine yol açan, pankreas β -hücrelerinin harabiyetidir. İki başlık altında incelenebilir (11):

-İmmün-aracılı diyabet: Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucunda ortaya çıkan otoimmün bir hastalıktır ve diğer bazı otoimmün hastalıklar (Graves hastalığı, Haşimato tiroiditi, Addison hastalığı, vb)'la beraber bulunabilir.

Hastalık pankreas β -hücrelerinin, hücresel-aracılı otoimmün harabiyeti ve insülinopeni ile karakterizedir. Hastalığın % 85-90'ında β hücre-, insülin-, glutamil asit dekarboksilaz- ve tirozin fosfataz-antikorlarından bir veya birkaçının varlığı, harabiyetin immün aracılı olduğunu göstermektedir. Hastalık, DQA ve DQB genleriyle bağlantılı, güçlü bir HLA ilişkisine de sahiptir. HLA-DR/DQ allelleri, koruyucu olabileceği gibi, diyabete yatkınlığı da gösterebilir.

-İdiyopatik diyabet: Tip 1 DM'nin etiyojisi bilinmeyen formudur. β -hücre otoimmünitesi ile ilgili immünolojik bulgular yoktur ve hastalık HLA ile de ilişkili değildir.

II. Tip 2 Diyabet: Tüm olguların yaklaşık %90-95'inin oluşturan tip 2 DM, genellikle 40 yaşın üzerindeki popülasyonda kendini gösterir (17).

Heterojen bir hastalık olarak tanımlanan tip 2 diyabetin pek çok patolojik faktörle ilişkili olduğu düşünülmekte ve bunlar arasında,

-Hedef dokuların insülin etkisine direnci

-Yetersiz insülin salınımıyla sonuçlanan, ilerleyici β -hücre fonksiyon kaybı, hastalığın başlıca nedenleri olarak kabul edilmektedir. Hastalarda insülin düzeylerinin normal ya da yüksek bulunması, β -hücre fonksiyonunun normal fakat insülin direncini telafi edebilecek düzeyde insülin salınımının olmadığını göstermektedir (11,17).

Tip 2 DM, genellikle asemptomatik bir dönemi takiben kendini göstermektedir. Klasik semptomlar olmaksızın, çeşitli hedef dokularda patolojik ve fonksiyonel değişikliklere yol açan göreceli hiperglisemi nedeniyle, hastalık sinsi ilerleyebilir ve tanı konulması gecikebilir. Bu nedenle, diyabet tanısından hemen sonra, hastalarda mikro ve makrovasküler komplikasyonların oluşma riski çok yüksektir (11).

2.1.2. Diyabet için tanı kriterleri

Günümüzde diyabet teşhisi için, ADA tarafından önerilen üç kriter vardır (11):

- 1.Poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı gibi kronik diyabet semptomlarına ilaveten gün içinde, son yemek saatine bakılmaksızın, rasgele ölçülen plazma glukoz konsantrasyonu; ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/L) olmalıdır.
- 2.Açlık plazma glukozu (APG); ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/L) olmalıdır. (Açlık durumu, kişinin en az 8 saat boyunca hiç kalori almamış olmasına karşılık gelir).
- 3.Oral glukoz tolerans testi (OGTT) sırasında glukoz yüklemesini takiben ikinci saat plazma glukoz değeri ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/L) olmalıdır. OGTT sırasında, WHO tarafından tanımlandığı gibi suda çözülmüş 75 g anhidr glukoz ekivalan glukoz ile yükleme yapılmalıdır. Ancak OGTT'nin rutin olarak yapılması önerilmemektedir.

Belirgin bir hiperglisemi olmadığı takdirde, farklı bir günde testler tekrarlanarak, bu kriterler teyit edilmelidir. Ayrıca Hemoglobin A1c (HbA1c) değerlerinin de tanı amacıyla kullanımı önerilmemektedir (11).

Bu tanı kriterlerine göre, tip 1 diyabet daha kolay teşhis edilirken; tip 2 diyabetin teşhisi, genellikle ılımlı hipergliseminin varlığı nedeniyle, daha zor olabilir (17).

Bozulmuş Glukoz Toleransı (IGT): Uzman komite tarafından yayımlanan raporda, IGT'ye karşılık gelen ara bir grup tanımlanmıştır. Diyabet kriterlerini karşılamadığı halde, glukoz düzeyleri normalin üstünde olan kişiler, bu gruba dahildir. Bu kişilerin belirlenebilmesi için, OGTT yapılmaktadır (11,17).

Bozulmuş açlık glukozu (IFG): Bu yeni kategori, IGT'ye analog olmakla birlikte, normal ve diyabetikler arasında kalan açlık glukoz değerleriyle teşhis edilir (17). IFG için, APG değerleri ölçülerek tanı konulabilir (11):

2.2. DENEYSSEL DİYABET MODELLERİ

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, hastalıkların anlaşılmasında, uygulanan tedavilerin yönlendirilmesinde ve yeni tedavi yöntemlerinin ortaya çıkarılmasında önemli rol oynarlar. Diyabet modeli olarak en çok kullanılan hayvanlar, başta ratlar olmak üzere, kedi köpek, inek, tavşan ve farelerdir (18). Deney hayvanlarında kısmi pankreotektomi veya β hücrelerinin harap edilmesi yoluyla diyabet oluşturulabilmektedir (19). Deneysel diyabet oluşumunda kullanılan tüm kimyasal maddeler, ditizone gibi ilaçlar ve antiinsülin serum gibi antikolar, diyabetojenik ajanlar olarak adlandırılırlar (20). Kimyasal diyabetojenik ajanlar, seçici olarak pankreas β hücrelerindeki Langerhans adacıklarını yıkıma uğrattırlar (21).

Ratlarda normal glukoz konsantrasyonu 35-50 mg/dl iken; diyabetik olanlarda 200 mg/dl veya daha da üzerinde olabilir (20,21).

Ratlara uygulanan diyabetojenik ajanlar, genelde 2. saatte β hücrelerinde yıkımı başlatmakta ve bunu takip eden birkaç saat içinde, aşırı insülin salınımı nedeniyle, insülin şoku gelişmektedir. Bu safhada önlem alınmadığı takdirde, ratlarda ölüm oranı çok yüksektir. Daha sonra insülin yokluğuna bağlı olarak gelişen hiperglisemi; polidipsi, polifaji, poliüri, tüy renginde ve kalitesinde bozulma gibi semptomlarla kendini gösterir. İlerleyen günlerde bu semptomlara ilaveten asteni gelişir, dehidratasyon tablosu ortaya çıkar ve yağ kütlesinin kaybına bağlı olarak, ratlar

zayıflar. Çünkü insülin eksikliğinde aktive olan hormona duyarlı lipaz, adipoz dokunun hızla yıkılmasına ve serbest yağ asitlerinin birikimine yol açmakta; lipoliz hızındaki bu artış, kilo kaybı şeklinde kendini göstermektedir (22).

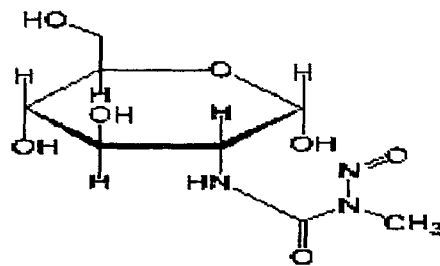
Alloksan ve streptozotosin (STZ), günümüzde deneysel diyabet oluşumunda tercihan kullanılan kimyasal ajanlardır (20,21). Mekanizmaları farklı olsa bile, her ikisinin de serbest oksijen radikalleri (SOR) aracılığıyla sitotoksik etki gösterdiği öne sürülmektedir (23).

2.3. STREPTOZOTOSİN

Streptozotosin, kanser tedavisinde kullanılan nitrozoüre grubu alkilleyici ajanlardan birisidir. İlk kez 1956'da antibiyotik olarak kullanılan STZ, 1960'lı yıllarda lösemi tedavisinde denenmiş ve antitümör özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Daha sonra fare ve maymunlarla yapılan toksikolojik çalışmalarda diyabetojenik etkisi tanımlanan STZ, deneysel diyabet modellerinde kullanılmaya başlanmıştır (24).

Günümüzde sentetik antineoplastik bir ajan olarak STZ'nin başlıca kullanım alanı, adacık hücreli karsinomaları kapsayan pankreas kanserleridir. Ayrıca karsinoid tümör, Hodgkin's hastalığı, kolon, karaciğer ve prostat kanseri gibi hastalıklarda diğer ilaçlarla kombine edilerek kullanılmaktadır (25).

Kimyasal yapı: İlk kez 1960'larda *Streptomyces achromogenes*'den fermantasyonla elde edilen STZ, bir glukoz-nitrozoüre bileşiğidir (23). STZ'nin yapısında glukozun 2. karbonuna metilnitrozoüre grubu bağlıdır (24):



Günümüzde yaygın olarak kullanılan sentetik STZ, D-glukozamin N-metilüre gibi kimyasal bileşikler kullanılarak, sentezlenebilmektedir. Kapalı formülü "C₈H₁₅N₃O₇"olan STZ'nin kimyasal adı "2-deoksi-2 (3-metil-3-nitrozo-üreido)-D-glukopiranoz"dur. Sentetik STZ, α ve β stereoizomerlerinin karışımından oluşur ve molekül ağırlığı 265 g/mol'dür (24).

2.3.1. Farmakokinetik ve Metabolizma

STZ'nin absorpsiyonu, organizmada dağılımı, metabolizması ve organizmadan atılımı, uygulama şekline ve doza bağlı olarak değişebilmektedir (25)

Absorpsiyon: Oral yolla alınan STZ, ancak %17-25 oranında emildiğinden, bu yolla kullanımı uygun değildir. STZ insanlarda intravenöz (*iv*) kullanılırken, deney hayvanlarında *iv*, subkutan (*sc*) veya intraperitoneal (*ip*) yollar tercih edilmektedir (25).

Dağılım ve metabolizma: STZ, tüm vücutta dağılmakla beraber, karaciğer (KC), böbrek ve pankreasta daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve başlıca bu dokularda metabolize edilir. STZ metabolizmasında ilk adım nonenzimatik reaksiyonlarla metil karbonyum iyonlarının oluşmasıdır (25).

Atılım: Absorblanan STZ'nin büyük kısmı, ilk 24 saat içerisinde organizmadan uzaklaştırılmaktadır. STZ'nin %60-72'si N-Nitrozoüre metabolitleri halinde ve %10-20'si hiç değişikliğe uğramadan böbreklerden atılırken; %5'i solunum ve %1'i safra yoluyla atılmaktadır (25).

2.3.2. Streptozotosin Dozu ve Deneysel Diyabetojenik Etki

Tip 1 diyabet oluşturmak amacıyla, yetişkin ratlarla yapılan deneysel çalışmalarda *iv* ya da *ip* olarak tek seferde kullanılan STZ dozu, 40 ila 60 mg/kg arasında değişmektedir. Ratlara 50 mg/kg dozda uygulanan STZ enjeksiyonundan iki hafta sonra, kan glukoz düzeylerinin 15 mmol/L'den daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık 40 mg/kg'ın altındaki tek doz kullanımlarda, STZ'nin etkisiz olduğu bildirilmektedir. STZ tek doz yerine, birden fazla düşük dozlarda uygulandığında da immün mekanizmaları etkilemek suretiyle Tip 1 diyabeti başlatabilir ve bu model daha çok fareler için kabul görmektedir (23).

STZ, kan insülin ve glukoz düzeylerini aynı anda fakat zıt yönde etkilemekte; enjeksiyondan iki saat sonra, kan insülin düzeyleri düşerken, glukoz düzeyleri yükselmektedir. Enjeksiyondan altı saat sonra, yüksek insülin düzeylerine hipoglisemi tablosu eşlik etmekte ve en sonunda insülin düzeylerindeki düşmeyle birlikte kalıcı hiperglisemi gelişmektedir (23).

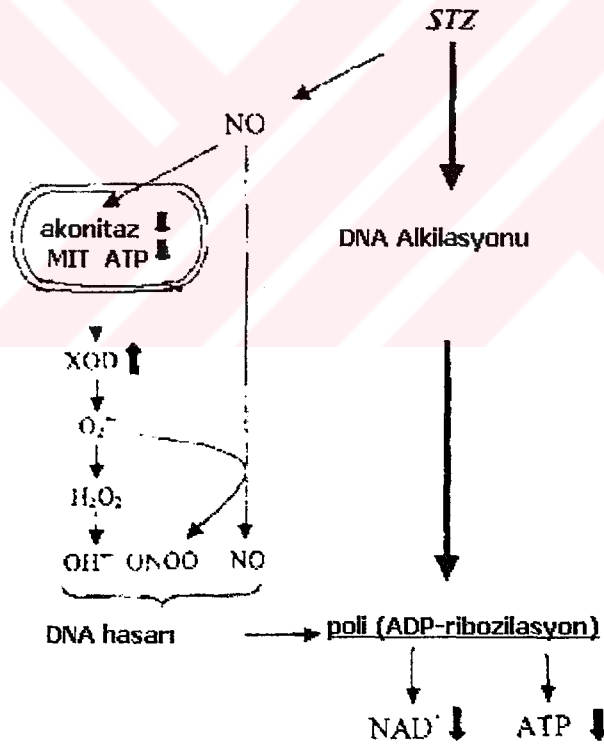
2.3.3. Etki Mekanizması

Alkilnitrozoüre grubu alkilleyici antineoplastik ajan olarak yaygın kullanımına rağmen (25), STZ'nin antineoplastik ve diyabetojenik etkileriyle ilgili mekanizmalar, henüz tam olarak açıklanamamaktadır. Bununla beraber, aşağıda verilen muhtemel

mekanizmalar üzerinde durulmakta ve bunların ayrı ayrı ya da birbirleriyle ilişkili olarak, STZ etkilerinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (26):

- DNA hasarı
 - Alkilasyon
 - Çapraz bağlanma reaksiyonları
- SOR üretimi
 - Mitokondriyal aktivitenin önlenmesi
 - Ksantin oksidaz (XOD) aktivasyonu
 - Nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit (ONOO) oluşumu

Kesin olmamakla birlikte STZ'nin yapısındaki glukoz nedeniyle, membran GLUT2 taşıyıcılarıyla pankreasın β hücrelerine girebildiği varsayılmaktadır. β hücrelerinde STZ'nin metabolizması sırasında metilkarbonyum iyonları üretilmekte ve bu toksik metabolitler alkilasyon ve/veya çapraz bağlanma reaksiyonuyla, DNA hasarına yol açmaktadır (Şekil 1) (26).



Şekil 1: STZ'nin etki mekanizması (26).

Bu toksisiteye karşı β hücrelerinde DNA onarım mekanizmaları tetiklenmekte; DNA nükleazlar tarafından tanınan ve uzaklaştırılan hasarlı kısımlar, DNA zincirlerinde kırılma ve kopmalara yol açmaktadır. DNA onarım mekanizmalarının tetiklenmesiyle sentezi ve aktivitesi artan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP),

substratı olan NAD^{+} 'ı kullanarak ADP-riboz ünitelerinin transferini katalizlemektedir. (26).

STZ'nin yol açtığı DNA hasarı ve tamir mekanizmalarındaki artış, sadece β hücrelerinde değil, KC'de de intraselüler NAD^{+} içeriğini azaltmakta ve böylece oksidatif fosforilasyon için gerekli kofaktörler ve ATP üretilmezken; protein sentezi, insülin salınımı ve iyon pompasındaki bozulma ile birlikte hücre ölümü gerçekleşmektedir (26). Sonuç olarak, ADP-ribozilasyon reaksiyonları sırasında intraselüler $NAD(P)^{+}$ düzeylerinin azalması, proinsülin sentezini baskılamakta ve β hücrelerinin hızlanmış nekrozuyla diyabet oluşmaktadır (Şekil 1) (24, 26).

STZ'nin mitokondriler ve XOD aracılığıyla SOR üretimini arttırdığı da öne sürülmektedir. β hücrelerinde Krebs siklusunu inhibe eden STZ'nin mitokondriyal oksijen tüketimini azalttığı ve böylece ATP üretimini baskıladığı düşünülmektedir. STZ, yapısında bulunan N-nitrozoüre nedeniyle, bir NO donörü olarak kabul edilmektedir. NO sentaza ihtiyaç duyulmadan, STZ'den spontan üretilen NO'nun da DNA hasarı ve β hücrelerinin yıkımında rol oynadığı varsayılmaktadır (23).

Diğer taraftan ATP'nin defosforilasyonu ile yükselen intraselüler adenozin düzeyleri, XOD aktivitesini artırmakta ve XOD reaksiyonuyla aşırı miktarda süperoksit radikali (O_2^-) oluşmaktadır. Bu radikaller de H_2O_2 , $^{\cdot}OH$ gibi diğer SOR türevlerinin oluşumunda rol oynamaktadır (Şekil 1) (24, 26).

2.3.4. Yan Etkileri

Potansiyel olarak mutajenik ve karsinojenik olan STZ kullanımıyla akut lösemi, renal neoplazmlar ve çeşitli atipik hücre gelişimi gibi vak'alar rapor edilmektedir (25).

STZ'nin yan etkileri, saatler-günler içerisinde kendini gösteren *akut* etkiler; günler-haftalar içinde görülen *erken* etkiler; haftalardan aylara *uzayan* etkiler ve hatta aylardan yıllara gibi uzun süreler sonunda ortaya çıkan *gecikmiş* etkiler şeklinde gruplandırılabilir (25).

2.4. DİYABETİK KOMPLİKASYONLARIN PATOGENEZİ

Diyabet komplikasyonlarının gelişiminde hipergliseminin rolü tam olarak açıklanamamakla birlikte, deneysel ve klinik çalışmalarla desteklenen birçok mekanizma öne sürülmektedir (1,3).

Hastalığın bizzat kendisinin SOR oluşumunu artırarak oksidatif strese yol açtığı; yüksek glukoz düzeyleriyle birlikte aşırı SOR birikiminin, organizmada birçok

biyokimyasal ve metabolik değişikliklere neden olduğu görüşü; gün geçtikçe önem kazanmaktadır (1).

Diyabet komplikasyonlarını açıklamak amacıyla önemle üzerinde durulan biyokimyasal metabolik değişiklikler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Aşırı SOR üretimi
 - Oksidatif stres
 - Karbonil stres
 - Tiyol stres
- Protein glikozilasyonu
 - Maillard reaksiyonu
 - A1C
 - İleri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end-products; AGE) oluşumu
- Sorbitol yolu

2.5. OKSİDATİF STRES

Organizmada, SOR'un aşırı üretildiği ya da antioksidan mekanizmaların yetersiz kaldığı durumlarda; oksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması, oksidatif stres olarak adlandırılır (27).

Oksidatif stresin varlığı, SOR ile etkileően nükleik asit, lipid, polisakkarit ve proteinler gibi temel hücre bileőenlerinden oluşan toksik bileşiklerin, hücre ve dokularda birikmesiyle yansıtılmakta ve hücre sel fonksiyonlarda SOR'a bağlı değişiklikler gözlenmektedir (27). Sonuç olarak oksidatif stres, hücre ve dokularda sadece yapısal hasara yol açmakla kalmayıp, hücre fonksiyonlarını da bozmakta; hatta oksidatif hücre hasarı, nekroz ya da apoptoz ile sonuçlanabilmektedir (28).

Oksidatif stresle oluşan başlıca doku hasarları aşağıdaki gibi sıralanabilir (sel 28):

- Lipid peroksidasyonu, membran fonksiyonlarının bozulması
- Protein oksidasyonu
- Mukopolisakkaritlerin yıkımı
- DNA yapısının bozulması (8-OH deoksiguanozin oluşumu ya da zincir kırılması)

Protein Oksidasyonu

Fizyolojik ve çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan SOR ve ayrıca, lipid ve karbohidratlardan türeyen ve yapılarında karbonil grubu bulunduran reaktif karbonil bileşikleri (reactive carbonyl compounds; RCC) gibi diğer reaktif maddeler,

proteinlerin yapısını değiştirebilmektedir. SOR'un proteinler üzerinde oluşturduğu oksidatif hasar, dört farklı şekilde gerçekleşebilir (29,30):

- Protein iskeletinin oksidasyonu
- Peptid bağlarının kırılması
- Amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu

Kovalent apraz bağlanma reaksiyonları

Amino Asit Yan Zincirlerinin Oksidasyonu: Protein yapısında bulunan amino asit yan zincirlerinin farklı SOR'larla etkileşimi farklı okside ürünleri oluşturabilmektedir (29):

Yan Zincir	SOR ile oluşan rnler
Alifatik	Hidroperoksitler, peroksi radikalleri ve karbonil bileşikleri
Heteroatom	Serin/treonin oksidasyonu; karbonil grubu içeren rnler
Aromatik	Fenilalanin, tirozin, triptofan ve histidin yapısında aromatik halka oksidasyonu

Bu okside ürünlerin ölçümüyle, artan SOR ve olası kaynağı belirlenebilmektedir. Örneğin, tirozin artığının HOCl ve HO[•]/HCl ile oksidasyonu sırasıyla, 3-klorotirozin ve ditirozini oluşturur (31).

Çapraz Bağlanma Reaksiyonları: SOR etkisiyle proteinlerde görülen intra ve inter moleküler çapraz bağlanmalar aşağıda verilen mekanizmalarla oluşabilir (30):

- Çapraz disülfid bağlarını oluşturmak üzere, sistein-tiyol gruplarının oksidasyonu
- Proteinin serbest amin grubuyla glikozile bir proteinin karbonil grubunun etkileşimi
- Protein-amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu ile oluşan karbonil gruplarının başka bir proteinin-serbest amin grubu ile etkileşimi
- İki farklı proteinde ki karbon merkezli radikallerin etkileşimi ile karbon-karbon kovalent bağlarının oluşması
- Lipidlerden türeyen aldehitlerin karbonil gruplarının aynı/ farklı protein zincirinde bulunan histidin (imidazol), lizin (C-NH₂) ve sistein (SH) gibi amino asit artıklarının serbest amin gruplarıyla *Schiff* bağı oluşturması.

Kovalent apraz bağlanma reaksiyonlarına katılan serbest amin grubu, genellikle protein yapısında bulunan lizil-C-NH₂'dir. Histidin imidazol grubu da karbonil bileşikleriyle *Schiff* bağı oluşturabilmektedir (31).

Okside proteinlerin onarımı mümkün olmadığından, endojen proteazlarla proteolitik olarak yıkılmaları gerekir. Çapraz bağlı ya da glikozile protein konjugatları

tarafından bu endojen proteazların inhibisyonu da, okside proteinlerin birikimine yol açmaktadır. Bu nedenle hücrelerdeki okside protein düzeylerinin, protein oksidasyon hızı ile proteolitik yıkım hızı arasındaki dengeye bağlı olduğu ve dengenin bozulmasıyla, okside proteinlerin organizmada birikmeye başladığı söylenebilir (32).

Diğer taraftan oksidasyon, bireysel olarak proteinlerde biyolojik aktivite kaybına yol açsa da; okside proteinlerin organizmada birikimi; biyomoleküllerin katalitik ve yapısal bütünlüğünün kaybına ve/veya metabolik düzenleyici yolların kesintiye uğramasına neden olmakta ve böylece tüm hücre fonksiyonları bozulmaktadır (32).

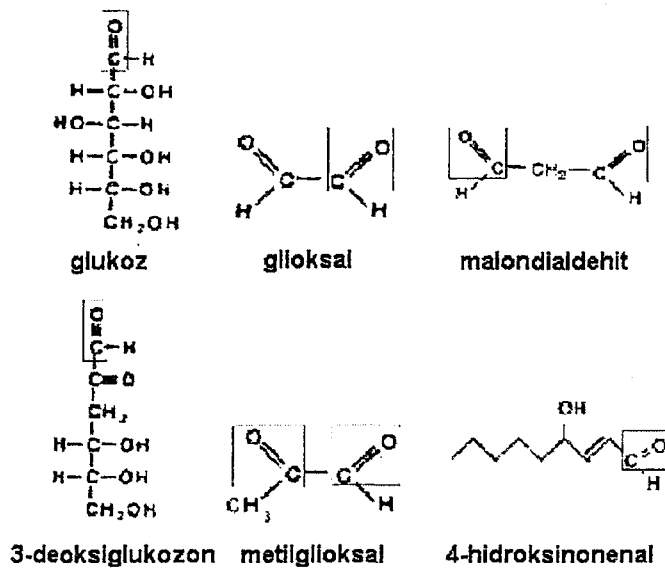
2.6. KARBONİL STRES

Amino asitler, karbonhidrat ve lipidlerin oksidasyonu ile oluşan ve yapılarında bulunan karbonil grubu (C=O) nedeniyle aşırı reaktivite gösteren RCC'lerin de SOR'a benzer şekilde, proteinleri irreversibl ve nonenzimatik olarak modifiye ettiği ve protein karbonil bileşikleri (protein carbonyl compounds; PCC)'ni oluşturduğu gösterilmiştir (33).

RCC oluşum hızı ile yıkım ya da atılım hızı arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olarak, organizmada RCC seviyelerinin artmasına ve başta proteinler olmak üzere, biyomoleküllere yaptığı toksik etkilerin tümüne "karbonil stres" denilmektedir (33).

2.6.1. Reaktif Karbonil Bileşikleri

İnsan metabolizmasında RCC tanımına uyan pek çok bileşik bulunmaktadır. Bu bileşiklerin, ortak bir özellik olarak, yapılarında karbonil grubu içermeleri dışında, diğer özellikleri oldukça büyük farklılıklar göstermektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Organizmada bulunan bazı RCC örnekleri (33).

Organizmada bulunan RCC'lere örnek olarak, 3-deoksiglukozon (3-DG), gliksal (GO), metilgliksal (MGO), malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE) verilebilir (33).

Bazı RCC'ler sadece karbonhidrat veya sadece lipid kaynaklı olabilirken; bazıları da hem karbonhidrat hem lipid kaynaklı olabilir. Ayrıca RCC'ler oluşum mekanizmalarında O₂ gereksinimi gösterip göstermemelerine göre de sınıflandırılabilirler (Tablo 1) (33).

Tablo 1. Organizmadaki bazı RCC'ler ve kaynakları (33).

RCC	Kaynak	O ₂ Gereksinimi
3-DG	Karbohidrat	Hayır
GO	Karbohidrat, lipid	Evet
MGO	Karbohidrat, lipid	Hayır
4-HNE	Lipid	Evet
MDA	Lipid	Evet

RCC'ler, başta proteinler olmak üzere, fosfolipid ve nükleik asit gibi biyomoleküllerin N-terminal amino grupları ile etkileşerek modifiye yapılar oluştururlar. Karbonil strese yol açan modifikasyonlar, üç farklı yoldan gerçekleşebilir (33):

- Metal aracılı oksidasyon reaksiyonları
- Glikasyon/glikoksidasyon reaksiyonları
- Lipoksidasyon reaksiyonları

Metal Aracılı Oksidasyon: Protein yapısındaki prolin, lizin, treonin ve arginin gibi amino asit yan zincirlerinin, başta alkoksi ve peroksi radikalleri olmak üzere, SOR ile oksidasyonu, PCC oluşumuyla sonuçlanmaktadır (30).

SOR türevlerinin hepsi, PCC oluşturabilecek kadar reaktif değildir (32). Geçiş metallerinin varlığında, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla, O₂^{•-} ve H₂O₂'den oluşan HO[•] radikalleri; hem alifatik yan zincirlerden hidrojen atomunu çıkarmak suretiyle standart protein oksidasyonunu başlatabilmekte (31) hem de alkoksi ve alkil peroksi gibi, PCC oluşturabilen yeni radikallerin türemesine öncülük etmektedir (30). Şekerlerin geçiş metalleriyle redüklenmesi sonucu GO, MGO, glikoaldehit gibi RCC özelliğine sahip bileşikler meydana gelmektedir (33).

Sonuç olarak, redoks siklusu oluşturabilen Fe(II)/Cu(I) gibi metal iyonlarının, protein üzerindeki katyon bağlanma bölgelerine tutunması, PCC oluşumuna yol açan metal aracılı oksidasyon reaksiyonlarının başlamasına neden olmaktadır (34).

Glikasyon/Glikoksidasyon Reaksiyonları: Molekül içinde veya moleküller arasında oluşabilen çapraz bağlanma reaksiyonlarının, protein oksidasyonu ve glikasyon reaksiyonları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (33).

Glikasyon; başta glukoz olmak üzere, redükten şekerlerin, nonenzimatik olarak kovalent bağlarla, proteinlerin amino gruplarına bağlanması olayıdır. “Maillard” olarak adlandırılan bu reaksiyonlar üç aşamada değerlendirilebilir: İlk aşamada, glukozun serbest karbonil grubu ile proteinlerin serbest amino grubu arasında reversibl *Schiff* bazı oluşmakta ve reaksiyonun ilerlemesiyle reversibl *Schiff* bazı, Amadori ürünleri olarak adlandırılan aldimin ve ketimin gibi glikozile protein gruplarına dönüşebilmektedir (1,3,33). Bu bağlanma türüne örnek olarak hemoglobinin non-enzimatik glikasyonu ile oluşan A1C verilebilir: Maillard reaksiyonuyla hemoglobin yapısındaki β zincirlerin N-terminalinde bulunan “valin” amino asitleri irreversibl olarak glikozillenmektedir. İlk defa 1968 yılında Rahbar tarafından HbA1c olarak tanımlanan glikozile hemoglobin, günümüzde A1C olarak kısaltılmakta ve diyabetik hastaların glisemik takibinde, kan glukoz ölçümü ile beraber kullanılmaktadır (35).

Glikoksidasyon ise, redükten şekerlere ilaveten şekerlerin oksidasyon ürünlerinin de protein amino gruplarının modifikasyonunu içeren, glikasyon ve oksidasyon reaksiyonlarıdır.

Burada önemli olan nokta, glikasyon reaksiyonlarının nonoksidatif ve nonenzimatik reaksiyonlarla gerçekleştiği; glikoksidasyon sürecinde ise SOR aracılı oksidatif reaksiyonların da rol oynadığıdır (33).

Maillard reaksiyonlarının ikinci aşamasında MGO, GO ve 3-DG gibi reaktif ara ürünler (α -oksoaldehitler) meydana gelir. Üçüncü ve son aşamada ise glikozile proteinin karbonil grubu, daha ileri bir reaksiyonla karboksilik asite oksitlenebilir ya da kovalent çapraz bağlanma reaksiyonlarıyla, başka bir proteinin serbest amino gruplarıyla *Schiff* bazı oluşturabilir ve bu yolla proteinler üzerinde AGE olarak adlandırılan pirolin, pentozidin, karboksimetillizin gibi irreversibl kompleks ve oldukça heterojen bileşikler oluşur. (1,30,33).

Lipoksidasyon Reaksiyonu: Lipoksidasyon terimi; biyomoleküllerin karbonil grubu içeren lipid peroksidasyon ürünleri ile modifikasyonunu tanımlamaktadır. MDA, 4-HNE, akrolein, GO gibi lipid peroksidasyon son ürünleri, proteinlerle reaksiyona

girerek irreversible nonenzimatik modifikasyonlara yol açarlar. Lipoksidasyon yoluyla oluşan MDA-lizin, 4-HNE-protein ve akrolein-protein kompleksi, karboksimetillizin gibi bileşikler, genel olarak ileri lipoksidasyon ürünleri (advanced lipoxidation products; ALE) olarak adlandırılırlar (33).

RCC'lerin karbonhidrat, lipid ve hem karbonhidrat hem lipid kaynaklı olması; ayrıca AGE ve ALE oluşturma mekanizmalarının benzerlik göstermesi nedeniyle; AGE ve ALE terimlerinin yerine ileri glikasyon veya lipoksidasyon ürünü (either advanced glycation or lipoxidation end product; EAGLE) terimi önerilmektedir (33).

2.6.2. Protein Karbonilasyonu

Protein karbonilasyonu irreversible bir oksidatif protein modifikasyonudur. Karbonillenmiş proteinler onarılamazlar; ya proteolitik olarak yıkılırlar yada hasarlı-modifiye protein yapıları şeklinde birikirler (36).

Karbonil grupları (aldehit veya ketonlar) çeşitli mekanizmalarla farklı bölgelerden protein yapısına girerler (36):

- Protein yan zincirlerinde ki prolin, lizin, treonin ve arginin amino asitlerinin okside olarak keto/aldehit türevlerine dönüşmesi
- Proteinlerin alfa-amidasyon yolu ile oksidatif parçalanması ve alfa ketoaçil gruplarının oluşumu
- Lipid peroksidasyonu sırasında üretilen ve aynı zamanda birer RCC olan 4-HNE, MDA ve akrolein gibi ürünlerin, protein zincirinde bulunan histidin, lizin ve sistein gibi nükleofilik artıklarla reaksiyonu
- Redükte şekerlerin ve şeker-oksidasyon ürünlerinin, sırasıyla glikasyon ve glikoksidasyon mekanizmalarıyla, lizil-C-NH₂ ile etkileşimi

Yarı ömür ve stabilitelerinin uzun olması nedeniyle, okside proteinlerin, *in vivo* oksidatif stresin göstergesi olarak kullanılabilmesi öne sürülmektedir (31).

Proteinlerdeki karbonil grubunun miktarı ile oksidatif stres kaynaklı protein hasarı arasında çok yüksek bir korelasyon bulunduğundan; biyolojik örneklerde PCC düzeylerinin tayini, oksidatif protein hasarının derecesini belirlemede iyi bir gösterge olarak kabul edilmektedir (34, 36).

PCC, karbonil gruplarına spesifik 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) varlığında, dayanıklı hidrazon türevlerine dönüşebilmektedir. Hidrazon oluşumunun kantitatif tayini, spektrofotometrik yöntemlerle yapılabildiğinden, plazma ve/veya doku PCC düzeyleri ölçümü, basit ve ucuz bir oksidatif stres parametresi olarak kullanılmaktadır (34).

2.7. TIYOL STRES

Başlıca intraselüler antioksidanlar olarak kabul edilen serbest tiyol (-SH) gruplarının SOR ile etkileşimi bu grupların reversibl oksidasyonu ile sonuçlanır. Sistein, redükte glutasyon (GSH) gibi serbest tiyol grubu içeren bileşiklerin yanı sıra başta albumin olmak üzere proteinler de organizmanın başlıca tiyol kaynağını oluşturmaktadır. Albumin ekstraselüler, GSH ise intraselüler tiyol bileşikleri içerisinde en önemlileridir (27).

Tiyol grubu oksidasyonu aynı zamanda bir protein oksidasyon marker'ı olarak da düşünülebilir. Oksidatif strese sekonder gelişen tiyol kaybı, Himmelfarb ve ark (37) tarafından “*Tiyol stres*” olarak adlandırılmıştır. Bu nedenle organizmada *tiyol stres* durumunun belirlenmesi, hem antioksidan gücün kaybını hem de protein oksidasyonunu göstermesi bakımından büyük önem taşımaktadır.

Plazma tiyol düzeylerinin tayini, proteinlerin SOR aracılı oksidasyondan ne denli etkilendiklerini göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Çünkü (27,31):

- Tiyol gruplarının oksiasitler gibi diğer okside türlere ya da disülfidlere dönüşmesi; proteinlerin radikal aracılı oksidasyonu sırasında, en önce gözlenen olaylardan biridir.
- Protein yapısındaki amino asitlerin çoğu, H₂O₂ varlığında, küçük değişiklikler geçirirken; tiyol grupları tüketilmekte ve protein üzerinde sülfid türevleri oluşmakta; böylece proteinde yapısal değişiklikler meydana gelmektedir.

Diğer taraftan, GSH ve sistein gibi serbest tiyol grubu içeren bileşikler, radikallerle direkt veya indirekt reaksiyona girerek ya da protein üzerindeki serbest tiyol gruplarıyla reversibl bağlar oluşturarak, proteinlerin oksidatif hasara uğramalarını önleyebilmektedirler (27).

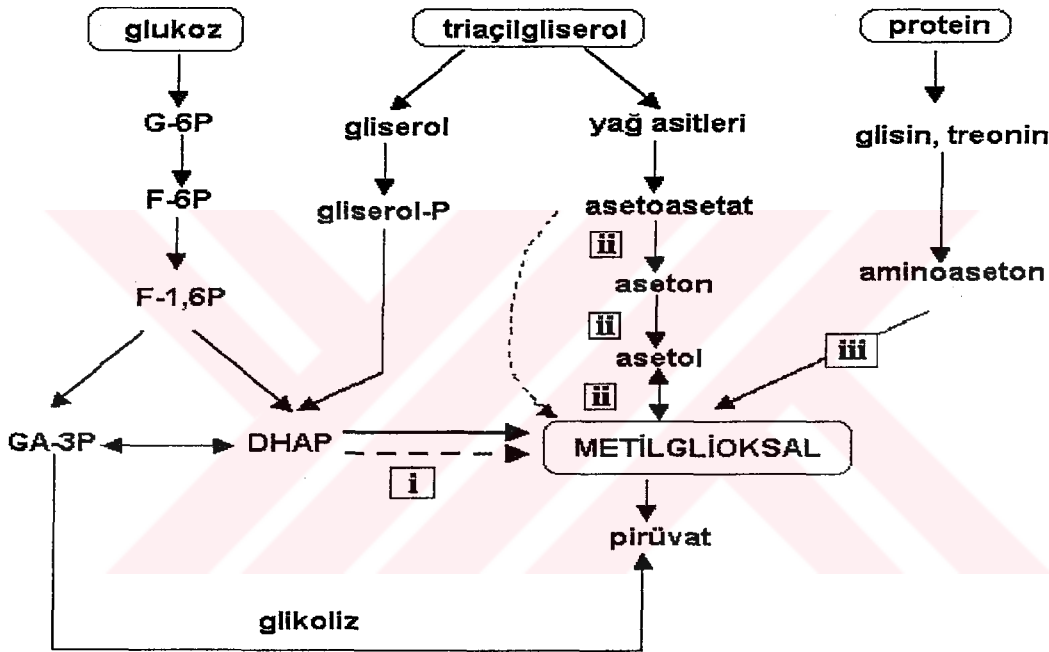
2.8. METİLGLİOKSAL

Günümüzde bir RCC olarak tanımlanan MGO ile ilgili ilk araştırmalar, 19.yy'ın sonlarında başlamıştır (38). Organizmada karbonhidratlar, lipidler ve hatta proteinlerden türeyebilen MGO, çift karbonil grubu içeren, üç karbonlu bir aldehittir (Şekil 2) (33). Bu spesifik yapısı nedeniyle MGO; pirüvaldehit, pirüvik aldehit, 2-okzopropanol, 2-ketopropil aldehit, asetil formaldehit olarak da adlandırılmaktadır.

2.8.1. Sentezi

Organizmada MGO oluşumunda yer alan metabolik yollar şu şekilde sıralanabilir (Şekil 3) (38,39):

- Glikoliz
- Trioz fosfat izomeraz reaksiyonu
- Trioz fosfatların nonenzimatik defosforilasyonu,
- Glikozile glukozun parçalanması,
- Aseton gibi keton cisimciklerinin oksidasyonu,
- Karaciğerdeki sitokrom P450 reaksiyonuyla
- Nötrofiller kaynaklı myeloperoksidaz ile asetoasetatın oksidasyonu
- Treonin ve glisinden oluşan aminoasetonun amin oksidazlarla yıkımı



Şekil 3: Organizmada MGO Oluşumu

2.8.2. Yıkımı

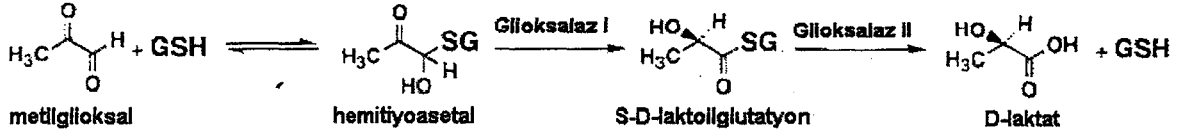
Organizmada MGO yıkımından sorumlu olan başlıca yollar, tüm hücrelerin sitozolünde bulunan gliksalaz detoksifikasyon sistemi ve alfa-keto aldehit dehidrogenaz yoludur (38).

Gliksalaz Sistemi

Kofaktör olarak GSH kullanan gliksalaz sistemi, iki farklı enzim aktivitesine sahiptir:

- Gliksalaz I (S-laktoilglutatyon MGO liyaz; EC 4.4.1.5)
- Gliksalaz II (S-2-hidroksiaçilglutatyon hidrolaz; EC 3.1.2.6)

Gliksalaz sistemiyle MGO'nun yıkımı, üç aşamada gerçekleşir (40):



İlk aşamada MGO'nun GSH ile nonenzimatik olarak oluşturduğu hemitiyoasetal, ikinci aşamada glioksalaz I aktivitesiyle S-laktoilglutatyon (SLG)'a dönüşmekte ve bu ara ürün, son aşamada glioksalaz II aktivitesiyle laktat ve GSH'a ayrılmaktadır (40).

Son yıllarda glioksalaz sisteminin yanı sıra, NADP'ye bağlı MGO dehidrogenaz (2-okzoaldehit: NAD(P)⁺ oksidoredüktaz; EC 1.2.1.23)'in da, MGO metabolizmasında rol alan bir başka enzim olduğu bildirilmiştir (38).

Fizyolojik koşullarda bile MGO'nun protein yapılarında bulunan arginin ve lizin artıklarına bağlandığı ve MGO ile reversibl/irreversibl olarak modifiye edilen proteinlerin, makrofaj reseptörleri tarafından tutularak yıkıldığı bildirilmektedir (41).

Glioksal, MDA gibi diğer dikarbonil bileşikleri ile karşılaştırıldığında MGO'nun, çapraz bağlanma ürünleri oluşturan en güçlü ajan olduğu bildirilmektedir (42). Aerobik şartlarda MGO'nun amino asitlerle/proteinlerle (albümin, kazein, kollajen, ve tubulin K12) girdiği glikoksidasyon reaksiyonları; süperoksit anyonu, çapraz bağlanmış radikal katyonu ve MGO radikal anyonu olmak üzere üç çeşit radikal oluşumuyla sonuçlanmaktadır (38).

Son yıllarda MGO'nun AGE oluşumunda en önemli prekürsör olduğu öne sürülmekte ve bu görüş, diyabetik hastalarda ve deneysel diyabet modellerinde, plazma ve/veya doku MGO düzeylerinin yüksek bulunmasıyla desteklenmektedir (38).

2.9. MELATONİN

Melatonin, karanlıkta pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur.

Dolaşımdaki triptofanın aktif transportla pinealosit içine alınmasıyla başlayan MEL sentezi, dört ardışık enzimatik reaksiyon sonucunda tamamlanır: İlk aşamada hidroksilasyon reaksiyonuyla oluşan 5-OH triptofan, dekarboksilasyonla serotonine dönüşmekte ve daha sonra sırasıyla N-asetilasyon ve O-metilasyon reaksiyonlarıyla, serotoninden MEL (5-metoksi-N-asetiltriptamin) oluşmaktadır (43). MEL sentezinde

hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) aktivitesi, cAMP etkisiyle yükselmekte ve böylece sentezlenen ve salgılanan MEL miktarı artmaktadır (43,44).

Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen MEL, lipofilik özelliği nedeniyle, hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilir. MEL için (43), sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır (44).

MEL yıkımı başlıca karaciğerde gerçekleşir. MEL'in idrardaki başlıca metaboliti olan 6-sülfatoksi melatonin düzeyleri, MEL'in plazma düzeyleri kadar, sentez ve yıkımı için de iyi bir göstergedir (8,43,44).

Melatoninin Antioksidan Etkisi

MEL'in antioksidan etkisi, literatürde ilk kez 1991 yılında Ianas ve ark (45) tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla bu görüş desteklenmiştir (8-10). Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, MEL'in antioksidan özelliği;

- Direkt antioksidan etki
- Antioksidan enzim aracılı etki
- Prooksidan enzim aracılı etki

şeklinde üç ana başlık altında toplanabilir.

1. Direkt antioksidan etki: MEL'in HO[•], H₂O₂, ¹O₂, HOCl, NO[•], ONOO⁻ gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir. MEL'in antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır (43).

Çeşitli antioksidanların gücünü belirlemek amacıyla yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, MEL'in en güçlü antioksidanlardan biri olduğunu göstermektedir.

Askorbat, alfa-tokoferol ve GSH gibi zincir reaksiyonlarını kırabilen diğer antioksidanlardan farklı olarak; MEL yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu peroksil radikalini yakalayıp sonlandırmaktadır (8). MEL'in bu antioksidanlardan daha güçlü olduğu (43), GSH'dan 5 kat ve mannitolden 14 kat daha güçlü bir şekilde OH[•] radikalini yakaladığı (8) *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir.

2. Antioksidan Enzim Aracılı Etki: Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki MEL'in, pek çok antioksidan enzimin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir (43).

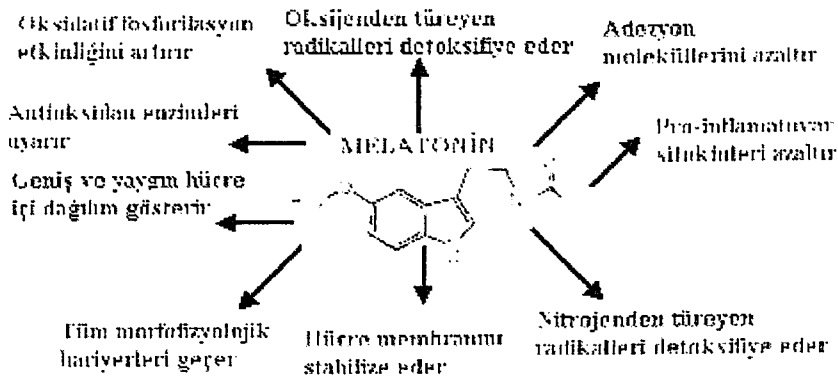
3. Prooksidan Enzim Aracılı Etki: MEL'in bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir (43). *In vitro* ve *in vivo* şartlarda, NO[•] ve daha ileri

aşamada ONOO⁻ oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin, fizyolojik MEL konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir (8).

MEL'in bu antioksidan etkilerini destekleyecek şekilde; oksidatif doku hasarına yol açan streptozotosin (9) alloksan (10), gibi toksinlerle indüklenen oksidatif stresin MEL ile önlenebildiği, *in vivo* çalışmalarla da gösterilmiştir.

Bunların dışında MEL hem suda ve hem de lipid fazda çözünebildiğinden, organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen MEL için, bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, MEL'in tüm intraselüler bölgelere ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece MEL, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde SOR hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan MEL, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. MEL varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan O₂⁻, H₂O₂ ve HO⁻ gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, MEL'e bir üstünlük sağlamaktadır (8,43,44) Daha da önemlisi, diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, MEL'in toksik bir etki göstermemesidir (43).

MEL'in antioksidan etkileri genel olarak incelendiğinde, adezyon moleküllerinin ve pro-inflamatuvar sitokinlerin sentezini azaltmasını da içeren oldukça geniş spektruma sahip bir antioksidan olduğu görülebilir (Şekil 4) (43).



Şekil 4: Melatoninin Antioksidan Özellikleri (43).

MEL gibi güçlü bir antioksidanın, patogenezinde serbest radikal hasarı olduğuna inanılan Alzheimer hastalığı, sepsis, iskemi/reperfüzyon, ultraviyole radyasyonuna bağlı eritem, demir ve eritropoetin uygulaması gibi patolojilerde, klinik kullanıma da girdiği bildirilmektedir (8,43).



GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (Proje no: TT-03-07) ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan (25 02 2003 tarih, 02 toplantı sayılı, karar no: 03/32) bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde yapıldı.

3.1. GEREÇ

Biyokimyasal ölçümlerde, analitik saflıkta ve/veya HPLC kalitesinde, Sigma (St Louis, MO, USA) ve Merck (Darmstadt, Germany) marka kimyasal maddeler kullanıldı.

Çalışma sırasında spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), soğutmalı santrifüj (Sigma 3K 30), pHmetre (Hanna HI 9321), derin dondurucu (Bosch), etüv (Dedeoğlu), su banyosu (Kottermann), hassas terazi (Sartorius; AND GR), vorteks (Elektromag, velp scientifica 2x³), manyetik karıştırıcı (Nüve), metabolik kafes (Harvard Apparatus Ltd. England, Code: 3700M071), otomatik (Nichiryo, Gilson) ve cam pipetler, polipropilen, ependorf ve cam tüpler, beher, mezür ve balon jöjeler kullanıldı.

Kullanılan pipet, tüp, mezür, beher, balon jöje gibi cam malzemeler ve polipropilen tüpler %20 nitrik asit içinde 24 saat bekletildikten sonra, deiyonize su ile 3 kez yıkanarak demineralize edildi (46). Ölçümlerde kullanılan çözelti ve tamponların tamamı Tip I su ile hazırlanarak çalışma süresince soğuk odada saklandı. Dayanıklılığı kısa süreli olan çözeltiler ise çalışma anında hazırlanarak kullanıldı.

Çalışma Grubu: Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya DEKAM'da üretilen Sprague Dawley, 4-5 aylık, 250-350 g ağırlığında, 40 erkek rat çalışma grubunu oluşturdu. Çalışma süresince, 12 saat karanlık/aydınlık döngüsünde, normal oda sıcaklığı ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) ve neminde tutulan ratlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Çevreye adapte olmalarını sağlamak amacıyla, çalışmaya başlamadan en az bir hafta önce, ratlar aynı deney ortamına alındı.

Çalışma Planı: Ratlar; kontrol, MEL, STZ ve STZ-MEL grubu olmak üzere, her biri 10 rat içeren dört gruba ayrıldı.

Preparat uygulamalarına başlamadan önce (**0. gün**), çalışma grubunu oluşturan ratlar, tartıldıktan sonra, 24 saat boyunca metabolik kafeslere yerleştirildi. Bir gece aç bırakılan ratların, ertesi sabah metabolik kafeste toplanan 24 saatlik idrar hacimleri ölçüldü ve kuyruktan kanları ($\sim 0,5$ ml) alındı ve glukometre ile kan glukoz düzeyleri ölçüldü.

Diyabet oluşumunu sağlayan STZ dozunu belirlemek amacıyla, toplam 12 ratla bir ön çalışma yapıldı: her biri dört rat içeren üç gruba, sırasıyla tek doz 40; 50 ve 60 mg/kg STZ ip olarak uygulandı.

STZ (Sigma, S-0130), ışıktan korunarak bozulmasını önlemek amacıyla, alüminyum folyo ile sarılan tüp içerisinde SF ile çözüldü (47,48) ve uygun şekilde dilüe edildikten hemen sonra, 5 dakika içinde ratlara uygulandı.

Ön çalışmanın verilerine göre, 50 mg/kg STZ, tek doz olarak toplam 26 rata uygulandı. STZ uygulamasını takip eden 3. günde ratlardan kan ve idrar örnekleri alındı. Glukozüri ve 200 mg/dl'nin üzerinde kan glukoz düzeyi belirlenen ratlar diyabetik kabul edildi (49,50). Bu diyabetik ratlardan, STZ ve STZ-MEL grupları oluşturuldu.

Ratlara uygulanan preparat dozları ve uygulama süreleri, Tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2: Çalışma Grubunu Oluşturan Ratların Deney Planı

GRUPLAR	Uygulanan madde	Uygulanan Doz*	Uygulama	
			Şekli	Süresi (gün)
Kontrol	Serum fizyolojik	1.0 ml	ip	1
MEL	MEL	25	ip	42
STZ	STZ	50	ip	1
	NPH insülin	2 İU/haftada 3 gün	sc	42
STZ-MEL	STZ	50	ip	1
	NPH insülin	2 İU/haftada 3 gün	sc	42
	MEL	25	ip	42

*:mg/ml çözücü/kg rat ağırlığı/gün

Çalışma öncesi, uygulanacak MEL (Merck, M814537.0001), absöü etanolde (100 mg/ml) çözüldükten sonra, alikotlar (stok) halinde, -70 °C'de derin dondurucuda saklandı (51). Çalışma sırasında, stok MEL (10 mg/0.1 ml) alikotları, serum fizyolojik (SF) ile dilüe edilerek, MEL ve STZ-MEL grubundaki ratlar için günlük MEL dozları ayarlandı (Tablo 2) ve 42 gün boyunca her gün aynı saatte (09⁰⁰-10⁰⁰) ip uygulandı. Ayrıca, ratlar 3-5 gün aralıklarla tartılarak, ağırlık başına gerekli doz ayarlamaları yapıldı.

STZ ve STZ-MEL gruplarında, hiperglisemiye bağılı olası ölümleri önlemek amacıyla; ratlara 42 gün boyunca, haftada üç gün insülin (52) uygulandı (Tablo 2). Çalışma süresince, ratların hepsi her hafta tartıldı ve her gruptaki 5 rattan haftada bir 24 saatlik idrar ve 15 günde bir kan örnekleri alındı. İdrar örneklerinde, hacim ve striple glukoz ölçümü; kan örneklerinde, glukometre ile glukoz tayini yapıldı.

Son enjeksiyonu takiben, metabolik kafeslere alınan ratlar bir gece aç bırakıldı. Ertesi sabah, 24 saatlik idrar örnekleri alındıktan sonra, ratlar tartıldı ve kg rat ağırlığı başına 80 mg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer, 50 mg/ml'lik solüsyon) + 10 mg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer, %2'lik solüsyon) anestezi altında abdominal aortadan heparinize enjektörlere ve EDTA'lı tüplere kanları (5-7 ml) alındı. Son kan örnekleri alındıktan hemen sonra, anestezi altında sakrifiye edilen ratların KC'leri çıkartıldı ve kandan temizleninceye kadar, soğuk SF ile 3-4 kez yıkandı. Kurutma kağıtları ile fazla suyu alınan KC'ler tartıldı.

Heparinli kan örnekleri, +4°C'de 2000 g'de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları elde edildi ve alikotlar halinde, KC'lerle birlikte çalışma gününe kadar, -70 °C'de saklandı. EDTA'lı kan örnekleri, santrifüj edilmeksizin, A1C ölçümü için Metabolizma Laboratuvarına gönderildi ve aynı gün çalışıldı.

3.2. YÖNTEM

Ratlardan elde edilen tam kan, plazma, idrar ve KC dokusunda yapılan çalışmalar,

- Rutin biyokimya
- Doku ve plazma örneklerinde biyokimyasal çalışma

şeklinde iki başlık altında toplandı.

3.2.1. Rutin biyokimya analizleri

İdrar glukoz ölçümü: Her hafta ratlardan toplanan 24 saatlik idrar örneklerinde glukozu spesifik idrar stripleri (TECO DIAGNOSTICS, TC URS-10) ile semi kantitatif glukoz tayini yapıldı.

Kan glukoz ölçümü: On beş günde bir ratlardan alınan kan örneklerinde glukometre (Medisense Optium, Abbott) ile glukoz ölçümü yapıldı.

Tam kanda A1C tayini: Çalışma sonunda ratlardan alınan EDTA'lı kan örneklerinde, Metabolizma Laboratuvarında HPLC (Betamed) sistemi ile A1C ölçümü yapıldı.

3.2.2. Biyokimyasal çalışma

Ratlardan elde edilen KC dokularında GLO I ve GLO II aktiviteleri ile PCC, MGO ve tiyol düzeyleri tayin edildi. Plazma örneklerinde de PCC ve tiyol ölçümü yapıldı.

Ayrıca, bu parametrelerin ölçümünde kullanılan metotların tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla; ön-çalışma aşamasında kullanılan ratlardan plazma havuzu ve doku homojenat havuzu oluşturuldu. Plazma ve doku havuzunda ölçümler yapılarak, değişme katsayısı (CV) değerleri hesaplandı.

Karaciğer doku örneklerinin hazırlanması: Çalışma gününe kadar -70°C 'de saklanan KC parçalarından doku homojenatlarının hazırlanması sırasında yapılan tüm işlemler, buz içerisinde ve 4°C 'de yürütüldü. Homojenizasyon işlemi, teflon uçlu homojenizatör ile gerçekleştirildi.

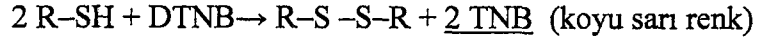
Kullanılan literatüre göre, doku homojenatlarıyla ilgili diğer metodolojik özellikler aşağıda verildi:

- KC parçası çözdürüldükten sonra, 3 kez daha soğuk SF ile yıkandı ve süzgeç kağıdı ile kurulandı. Hassas terazi ile 0.1 g ağırlığında tartılan yaş doku örnekleri, 2 ml 0.02 M EDTA ile homojenize edildi. Aynı gün doku tiyol tayininde kullanıldı (53).
- Buzu çözdürülen başka bir KC parçası, tekrar 0.015 M fosfat tamponlu salin (PBS) ile (pH 7.4) yıkayıp kurularak 1.0 g tartıldı ve $\frac{1}{4}$ (w/v) oranında PBS ile homojenize edildi. Alikotlar halinde dondurularak saklandı (54).
- Çalışma günü çözdürülen $\frac{1}{4}$ (w/v) doku homojenatları, PBS ile 1/10 oranında dilüe edilerek vorteksle karıştırıldıktan sonra, 20.000 g'de 15 dk santrifüjlendi. Elde edilen süpernatantlar PCC (34), MGO (55), GLO I (56) ve GLO II (57) ölçümlerinde kullanıldı.

3.2.2.1. Tiyol Tayini

Ratların plazma (58) ve KC dokularında (53) tiyol seviyeleri, spektrofotometrik yöntemlerle tayin edildi.

Metodun prensibi, aşağıdaki reaksiyon denkleminde görüldüğü gibi, serbest tiyol grupları tarafından, Ellman reaktifi [5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit); DTNB]'nin redüklenmesiyle açığa çıkan, koyu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'in renk şiddetinin 412 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanır (53,58).



Çözeltiler

- 0.1 M Tris-HCl tamponu, pH 8.2 (10 mM EDTA içerir)
- 0.2 M Tris-HCl tamponu, pH 8.2
- 0.02 M EDTA
- 10 mM DTNB (metanolde hazırlanır)
- 3.0 mM GSH (stok standart)

Plazma için çalışma yöntemi (58):

	Kör	Kontrol	Numune
0.1 M Tris-HCl	1.05 ml	1.0 ml	1.0 ml
Metanol	-	0.05 ml	-
Plazma	-	0.05 ml	0.05 ml
DTNB	0.05 ml	-	0.05 ml

Reaksiyon ortamına DTNB ilavesiyle inkubasyon süresi başlatılarak; kör, kontrol ve numune tüpleri, 25°C'de tam 15 dk inkube edildi. Daha sonra, kör tüpüne karşı, kontrol ve numune tüplerinin absorbansı 412 nm dalga boyunda ölçüldü ve ΔOD değerleri hesaplandı. Değerlendirme standart grafik üzerinden yapıldı.

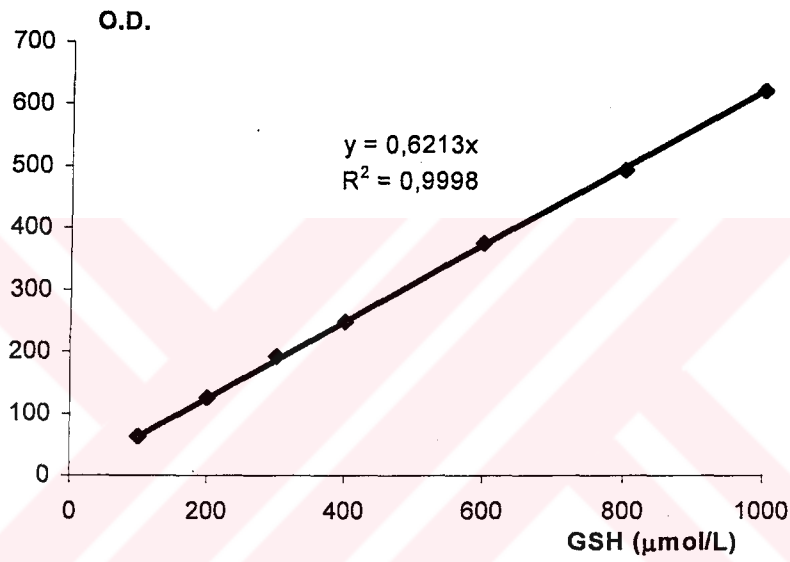
Doku için çalışma yöntemi (53):

	Kör	Kontrol	Numune
0.2 M Tris-HCl	0.300 ml	0.300 ml	0.300 ml
Metanol	1.60 ml	1.58 ml	1.58 ml
Doku homojenatı	-	0.02 ml	0.02 ml
0.02 M EDTA	0.100 ml	0.08 ml	0.08 ml
DTNB	0.02 ml	-	0.02 ml

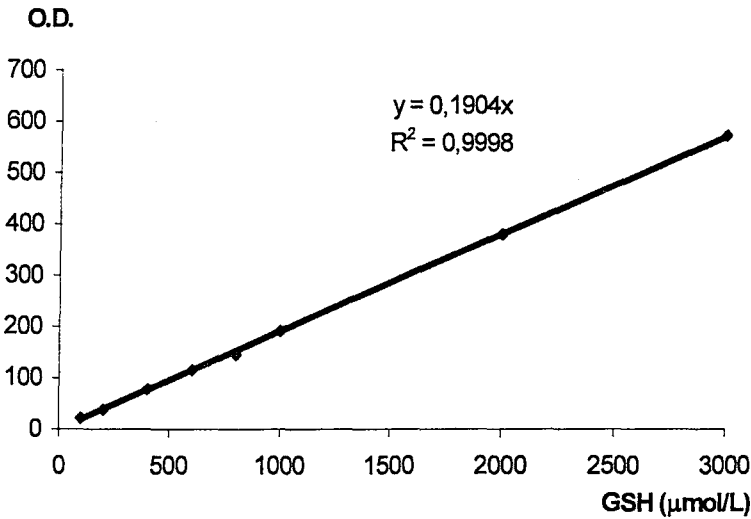
Reaksiyon ortamına DTNB ilavesiyle inkubasyon süresi başlatıldı. Kör, kontrol ve numune tüpleri, 30°C'de çalkalamalı su banyosunda tam 15 dk inkübe edildikten

sonra, 10.000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Kontrol ve numune tüplerinden elde edilen süpernatanın absorbanansı, kör tüpüne karşı, 412 nm'de ölçüldü ve ΔOD değerleri hesaplandı. Değerlendirme standart grafik üzerinden yapıldı.

Standart serinin hazırlanması: Stok GSH (3.0 mM) çözeltisi, plazma tiyol tayini için, 100; 200; 400; 600; 800 ve 1000 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarında ve doku tiyol tayini için, 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 2000 ve 3000 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarında standart seri oluşturacak şekilde Tip I su ile dilüe edildi ve her standart, numune gibi çalışıldı. GSH konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleriyle standart grafikler çizildi (Şekil 5 ve Şekil 6).



Şekil 5. Plazma için glutatyon standart grafiği.



Şekil 3.4. Doku-glutatyon standart grafiği.

Çalışma

	Numune	Kontrol
Plazma/Doku süpernatanı	0.2 ml	0.2 ml
DNPH	0.8 ml	-
2.5 M HCl	-	0.8 ml
Oda sıcaklığında, karanlıkta, çalkalamalı su banyosunda 1 saat inkübe edildi.		
%20 TCA	1.0 ml	1.0 ml
Buz içerisinde 10 dk inkübasyonu takiben, 11.000 g'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatan atıldı.		
%10 TCA	1.0 ml	1.0 ml
Protein pelletleri, sonikasyondan sonra vortekslenerek parçalandı ve santrifüj edildi; yıkama işlemi 2 kez tekrarlandı.		
Etanol/Etil asetat	1.0 ml	1.0 ml
Protein pelletleri, sonikasyondan sonra vortekslenerek parçalandı ve 10 dk inkübasyonu takiben santrifüj edildi ve yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.		
6 M Guanidin HCl	1.0 ml	1.0 ml
Çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de 15 dk inkübe edildi ve çözünmeyen materyal santrifüjle uzaklaştırıldı		
Supernatanların OD'si 360 nm'de deiyonize suya karşı okundu. Ayrıca kontrol tüplerinde 280 nm'de protein tayini yapıldı.		

Hesaplama

Numune ve kontrol OD değerlerinden ΔOD değerleri bulundu. PCC düzeylerini hesaplamak için, DNPH'nın molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanıldı (reznick). Plazma ve KC PCC değerleri, nmol/mg protein olarak verildi.

Plazma ve doku PCC ölçümünde kullanılan metotların CV değerleri, sırasıyla % 3.6 ve %5.2 olarak bulundu.

	Ölçüm sayısı	$X \pm SD$	CV(%)
Plazma PCC (nmol/mg protein)	12	0.44 \pm 0.016	3.6
Doku PCC (nmol/mg protein)	10	2,5 \pm 0,13	5.2

3.2.2.3. Metilglioksal Tayini

Plazma ve doku MGO seviyeleri, Cooper (55) tarafından geliştirilen metod kullanılarak tayin edildi.

Metodun prensibi, dialdehit yapısına sahip MGO'nun DNPH ile oluşturduğu fnilhidrazonların renk şiddetinin 550 nm de ölçülmesi esasına dayanmaktadır (55).

Doku süpernatantlarının ölçüme hazırlanması: Doku homojenatları (1/10 w/v)'nın santrifüjüyle elde edilen süpernatantların absorbansı 280 nm'de ölçülerek protein tayini yapıldı. Uygun şekilde dilüe edilen süpernatantlar MGO ölçümünde kullanıldı.

Çözeltiler

- % 0.1 DNPH (2 N HCl içinde hazırlanır)
- 2 N HCl
- %10 NaOH w/v)
- 6.6 M MGO (stok standart)

Çalışma

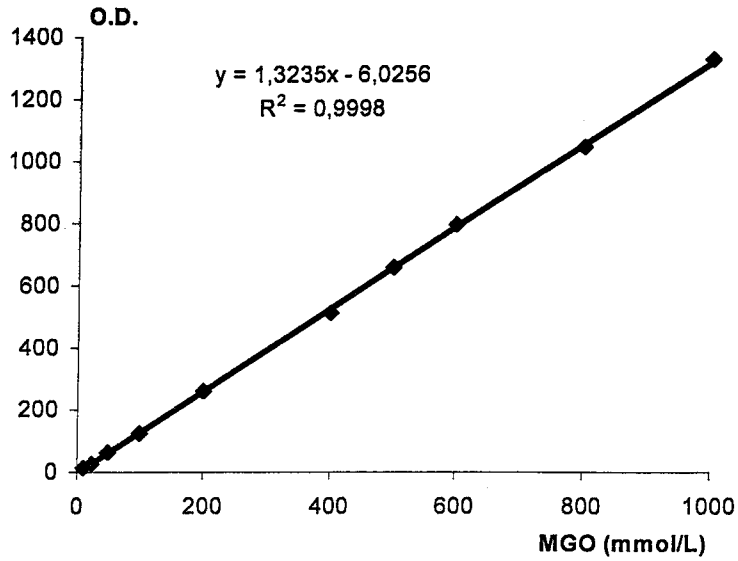
	Numune	Kontrol
Doku süpernatantı	0.03 ml	-
Tip I su	0.27 ml	0.3 ml
DNPH	0.1 ml	0.1 ml
DNPH ilavesiyle reaksiyon başlatılır. Karanlıkta 30 °C'de, çalkalamalı su banyosunda 15 dk inkübe edildi.		
%10 NaOH	0.5 ml	0.5 ml

Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.

Kontrol ve numune tüplerinin OD'si 550 nm'de deiyonize suya karşı okundu. Δ OD değerleri hesaplandı.

Değerlendirme standart grafik üzerinden yapıldı.

Standart serinin hazırlanması: Stok MGO (6.6 M) çözeltisinden, 100 mM konsantrasyonunda ara stok MGO hazırlandı ve 10;20;50;100;200;400;500;600; 800 μ mol/L konsantrasyonlarında standart seri oluşturacak şekilde Tip I su ile dilüe edildi ve her bir standart numune gibi çalışıldı. MGO konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleriyle standart grafik çizildi (Şekil 7).



Şekil 7. MGO standart grafiği

Standart grafikten bulunan doku MGO seviyeleri, aynı dokuda ölçülen protein değerlerine bölünerek, nmol/mg protein olarak verildi.

Doku MGO ölçümünde kullanılan metodun CV değeri, % 6,0 olarak bulundu.

	Ölçüm sayısı	X±SD	CV(%)
Doku MGO (nmol/mg protein)	10	2,03±0,12	6,0

3.2.2.4. Glioksalaz I Aktivitesi Tayini

Doku GLO I aktivitesi tayininde, Mannervick (56) tarafından geliştirilen metod kullanıldı.

Metodun prensibi; GSH ve MGO konjugasyonunu katalizleyen GLO I tarafından SLG oluşumunun, zamana bağlı OD artışı şeklinde 240 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (56).

Doku süpernatantlarının ölçüme hazırlanması: Doku homojenatları (1/10 w/v)'nın santrifüjüyle elde edilen süpernatantların absorbansı 280 nm'de ölçülerek protein tayini yapıldı. Uygun şekilde dilüe edilen süpernatantlar ölçümde kullanıldı.

Çözeltiler

- 0.1 M Potasyum fosfat tamponu (pH 6.6)
- 10 mM Potasyum fosfat tamponu (% 1 w/v albümin içerir, pH 7.4)
- % 0.2 (v/v) MGO
- %2 GSH (w/v)
- 200 ünite GLO I (Standart)

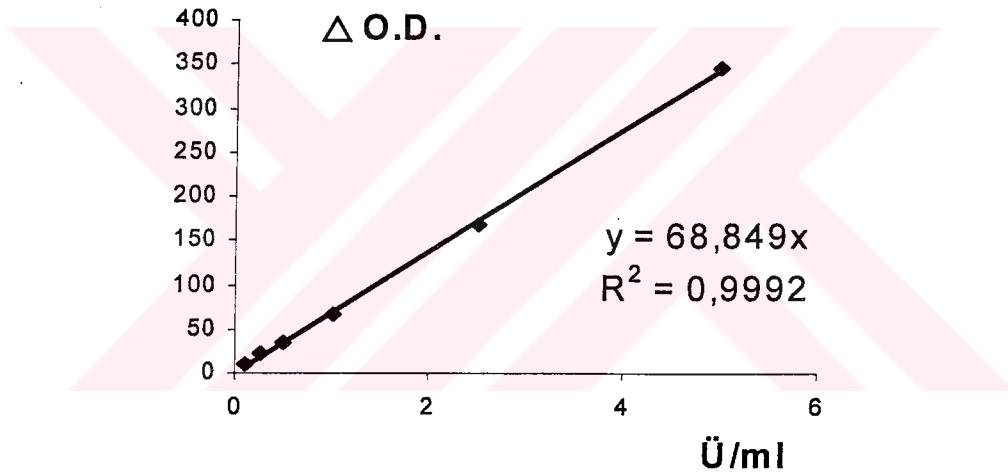
Çalışma

Reaksiyon karışımında 80 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 6.6), 2 mM MGO ve 1 mM GSH olacak şekilde gerekli pipetlemeler yapıldı ve 30 °C'de 10 dk inkübe edildi. Doku süpernatanı ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. SLG oluşumuna bağlı O.D. artışı, 240 nm'de 5 dk süreyle takip edildi ve Δ OD/dk değerleri bulundu.

1 ünite GLO I, standart deney şartlarında (30 °C, pH 6.6), MGO ve GSH'dan dakikada 1 mikromol SLG oluşumunu katalizleyen enzim aktivitesi (Ü/L: mikromol SLG/dk/L) olarak tanımlandı (56).

Değerlendirme standart eğri kullanılarak yapıldı.

Standart serinin hazırlanması: 200 ünite GLO I (Sigma, S-), 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5 Ü/ml konsantrasyonlarında standart seri oluşturacak şekilde 10 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) ile dilüe edildi ve her standart, numune gibi çalışıldı. GLO I konsantrasyonlarına karşılık gelen Δ OD/dk değerleriyle grafik çizildi (Şekil 8).



Şekil 8. GLO I standart grafiği

Standart grafikten bulunan doku GLO I aktiviteleri, aynı dokuda ölçülen protein değerlerine bölünerek, Ü/mg protein olarak verildi.

Doku GLO I ölçümünde kullanılan metodun CV değeri, % 4.62 olarak bulundu.

	Ölçüm sayısı	X±SD	CV(%)
Doku GLO I (Ü/mg protein)	12	0.078±0.0036	4.62

3.2.2.4. Glioksalaz II Aktivitesi Tayini

Doku GLO II aktivitesi tayininde, Racker (57) tarafından geliştirilen metod kullanıldı.

Metodun prensibi; GLO II tarafından SLG'nin laktata dönüşümü nedeniyle, OD'de meydana gelen düşüşün 240 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (57).

Doku süpernatantlarının ölçüme hazırlanması: Doku homojenatları (1/10 w/v)'nın santrifüjüyle elde edilen süpernatantların absorbansı 280 nm'de ölçülerek protein tayini yapıldı. Uygun şekilde dilüe edilen süpernatantlar ölçümde kullanıldı.

Çözeltiler

- 0.05 M Potasyum fosfat tamponu (pH 6.6)
- 4 mM SLG

Çalışma

Reaksiyon karışımında 46.5 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 6.6) ve 0.2 mM SLG olacak şekilde gerekli pipetlemeler yapıldı. Doku süpernatantı ilavesiyle reaksiyon başlatıldı. SLG yıkımına bağlı O.D. düşüşü, 240 nm'de 3 dk süreyle takip edildi ve $\Delta OD/dk$ değerleri bulundu.

Hesaplama

1 ünite GLO II, standart deney şartlarında (30 °C, pH 6.6), dakikada 1 mikromol SLG tüketimini katalizleyen enzim aktivitesi (Ü/L: mikromol SLG/dk/L) olarak tanımlandı (57).

SLG'nin molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=3.37 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak GLO II aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar spesifik aktivite (Ü/mg protein) olarak verildi.

Doku GLO II ölçümünde kullanılan metodun CV değeri, % 4.81 olarak bulundu.

	Ölçüm sayısı	X±SD	CV(%)
Doku GLO II (Ü/mg protein)	12	0,054±0,0026	4,81

3.2.3. İstatistiksel Değerlendirme

Ratlardan elde edilen biyolojik materyalde çalışılan parametrelerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS for Windows 10.0 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı:

- Çalışma gruplarının her birinde, parametrelerin zamana bağlı değişimi;
- Ölçüm yapılan günlere göre, aynı parametrelerin çalışma gruplarında birbiriyle karşılaştırılması;

sırasında ANOVA ve post-ANOVA (Scheffe prosedür) testleri kullanıldı.

Tüm istatistiki karşılaştırmalarda, anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.



BULGULAR

Bu çalışmada, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde bulunan Sprague Dawley, 4-5 aylık, 250-350 g ağırlığında, 40 erkek rat kullanıldı.

Her biri 10 rat içeren dört çalışma grubundan ikisinde, tek doz 50 mg/kg STZ uygulamasıyla diyabet oluşturuldu; STZ ve STZ-MEL olarak adlandırılan bu gruplara hiperglisemiye bağlı olası ölümleri önlemek amacıyla, 42 gün boyunca, haftada üç gün sc 2 IU NPH insülin uygulandı. STZ grubunun kontrolü olarak çalışmaya alınan kontrol grubuna, ip olarak tek doz SF verildi. STZ-MEL ve bu grubun kontrolü olarak kabul edilen MEL gruplarına 42 gün süreyle ip olarak MEL uygulandı.

Çalışmanın başında (0.gün) ve sonunda (42. gün) tüm ratlardan kan ve 24 saatlik idrar örnekleri alındı ve çalışma süresince, ratların hepsi her hafta tartıldı. Ayrıca her gruptaki 5 rattan haftada bir idrar ve 15 günde bir kan olmak üzere, toplam dört kez kan ve yedi kez idrar alınmış oldu. Çalışma sonunda kurban edilen ratların KC'leri çıkartıldı.

Tam kan, plazma, idrar ve KC dokusunda yapılan çalışmalara ait bulgular, rutin analiz bulguları ve biyokimyasal bulgular şeklinde iki başlık altında toplandı. Çalışma gruplarına ait tüm veriler, Ek Tablo 1 ve 2'de gösterildi. Bu verilerden elde edilen grup ortalama değerleri, Tablo 3-18'de, aritmetik ortalama ve standart sapma ($\bar{x} \pm SD$) şeklinde verildi. İstatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

RUTİN ANALİZ BULGULARI

Ratlardan elde edilen tam kan, plazma ve idrar örneklerinde yapılan rutin analiz sonuçları, vücut ağırlığı ve günlük idrar hacmi değerleri, ölçüm yapılan günlere göre,

- Her grubun kendi içinde karşılaştırılması (Tablo 3-6)
- Çalışma gruplarının birbiriyle karşılaştırılması (Tablo 7-13)

şeklinde değerlendirildi.

Ölçüm yapılan günlerde, her çalışma grubundan beş rata ait bulgular, grup içi karşılaştırıldığında; kontrol grubu ratlarında ölçülen kan glukozu ve idrar hacmi değerlerinin çalışma süresince değişmediği; sadece ratların ağırlığının giderek arttığı ve bu artışın dördüncü haftadan itibaren anlamlı olduğu; çalışma sonunda ratların ağırlığında % 8,3 oranında bir artış olduğu belirlendi (Tablo 3).

Tablo 3: Kontrol ratları (n: 5)'nda ölçülen parametrelerin günlere göre değerlendirilmesi

Gün/hafta	Rat ağırlığı (g)	İdrar hacmi (ml)	Kan glukozu (mg/dl)
0. gün	319 ± 11	9.8 ± 1.5	94 ± 13
1. hafta	326 ± 12	9.0 ± 1.0	
2. hafta	334 ± 12	9.8 ± 1.1	92 ± 8
3. hafta	339 ± 10	10.0 ± 1.6	
4. hafta	346 ± 4*	11.2 ± 0.8	88 ± 9
5. hafta	347 ± 10*	11.6 ± 1.8	
6. hafta	348 ± 11*	11.2 ± 2.3	93 ± 8

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: 0. gün (*) değerleri ile yapılan karşılaştırmalarda elde edildi.

MEL grubunda ölçülen parametrelerin günlere göre değişimi, Tablo 4'te gösterildi.

Tablo 4: MEL grubu (n:5)'nda ölçülen parametrelerin günlere göre değerlendirilmesi

Gün/hafta	Rat ağırlığı (g)	İdrar hacmi (ml)	Kan glukozu (mg/dl)
0. gün	296 ± 20	12.4 ± 4.3	76 ± 10
1. hafta	280 ± 21	12.2 ± 3.8	
2. hafta	292 ± 25	12.0 ± 3.4	80 ± 9
3. hafta	302 ± 28	12.0 ± 2.9	
4. hafta	299 ± 26	11.6 ± 2.6	77 ± 7
5. hafta	313 ± 26	12.2 ± 3.3	
6. hafta	312 ± 26	13.6 ± 1.6	86 ± 7

MEL grubu, ölçüm yapılan günlere göre, kendi içinde değerlendirildiğinde; kontrol grubuna benzer şekilde, çalışma süresince kan ve idrar değerlerinde bir değişiklik olmadığı; rat ağırlığının ise çalışma bitiminde % 5 oranında arttığı gözlemlendi (Tablo 4).

STZ grubunda ölçülen parametrelerin günlere göre değişimi, Tablo 5'te gösterildi.

Tablo 5: STZ grubu (n: 5)'nda ölçülen parametrelerin günlere göre değerlendirilmesi

Gün/hafta	Rat ağırlığı (g)	İdrar hacmi (ml)	Kan glukozu (mg/dl)
0. gün	351 ± 15	8.6 ± 0.9	86 ± 3
3. gün	292 ± 15*	16.0 ± 2.5	287 ± 37*
1. hafta	276 ± 13*	20.8 ± 4.4*	
2. hafta	266 ± 17*	20.8 ± 3.6*	331 ± 59*
3. hafta	259 ± 11*	21.2 ± 4.2*	
4. hafta	240 ± 14 ^{*,a,b}	22.8 ± 2.7*	286 ± 30*
5. hafta	231 ± 12 ^{*,a,b}	23.4 ± 3.1*	
6. hafta	223 ± 14 ^{*,a,b,c}	23.6 ± 3.1*	340 ± 40*

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: 0. gün (*), 3. gün (a), 1. hafta (b) ve 2. hafta (c) değerleri ile yapılan karşılaştırmalarda elde edildi.

Tablo 5'te görüldüğü gibi, STZ uygulamasını takiben üçüncü günden itibaren, ratların kan glukoz değerlerinin önemli ölçüde yükseldiği ve ratlarda diyabet oluştuğu belirlendi. Çalışma süresince hipergliseminin devam ettiği ve yüksek kan glukoz değerlerinin istatistiki bakımdan anlamlı olduğu görüldü. Benzer şekilde, diyabet oluşumunu takiben, birinci haftadan itibaren çalışma süresince ratların daha fazla idrar çıkardıkları gözlemlendi. STZ uygulamasıyla üçüncü günde başlayan kilo kaybının çalışmanın sonuna kadar devam ettiği ve birinci haftadan itibaren haftalık değişimlerin istatistiki bakımdan anlamlı olduğu bulundu.

STZ-MEL grubunda ölçülen parametrelerin günlere göre değişimi, Tablo 6'da gösterildi.

STZ-MEL grubunda ölçülen parametreler, günlere göre değerlendirildiğinde, STZ grubunda olduğu gibi, STZ uygulamasını takiben üçüncü günden itibaren, ratların kan glukoz değerlerinin önemli ölçüde yükseldiği ve ratlarda diyabet oluştuğu belirlendi. Çalışma süresince hipergliseminin devam ettiği ve yüksek kan glukoz değerlerinin istatistiki bakımdan anlamlı olduğu görüldü. Diyabet oluşumuyla birlikte ratların giderek daha fazla idrar çıkardıkları ve idrar hacmindeki artışın istatistiki bakımdan

anamlı olduğu belirlendi. Ratlarda STZ uygulamasıyla başlayan kilo kaybının birinci haftadan itibaren istatistiki önemi olduğu ve çalışma süresince ratların giderek zayıfladığı görüldü (Tablo 6).

Tablo 6: STZ-MEL grubu (n: 5)'nda ölçülen parametrelerin günlere göre değerlendirilmesi

Gün/hafta	Rat ağırlığı (g)	İdrar hacmi (ml)	Kan glukozu (mg/dl)
0. gün	376 ± 22	8.2 ± 1.5	85 ± 4
3. gün	314 ± 32	17.2 ± 1.1*	262 ± 61*
1. hafta	299 ± 32*	18.0 ± 0.0*	
2. hafta	291 ± 31*	17.6 ± 3.6*	282 ± 35*
3. hafta	275 ± 29*	20.8 ± 1.8*	
4. hafta	255 ± 33*	20.8 ± 2.3*	297 ± 58*
5. hafta	249 ± 27*	17.8 ± 1.8*	
6. hafta	241 ± 19*	22.4 ± 1.7* ^a	290 ± 54*

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: 0. gün (*) ve 3. gün (a) değerleri ile yapılan karşılaştırmalarda elde edildi.

Çalışma gruplarından her hafta toplanan 24 saatlik idrar örneklerinde stripe bakılan glukoz sonuçları değerlendirildiğinde; çalışma süresince kontrol ve MEL gruplarını oluşturan ratların idrarında glukoz olmadığı tespit edildi. Buna karşılık, hem STZ ve hem de STZ-MEL gruplarında, STZ uygulamasını takip eden üçüncü günden başlayarak, çalışmanın sonuna kadar, idrar glukoz değerleri, +3 veya +4 pozitif olarak değerlendirildi.

Çalışmanın 0. ve 42.(6. hafta) günlerinde, grupları oluşturan ratların hepsinden; 1.ila 5. haftalarda da beşer tanesinden alınan kan ve idrar örneklerinden elde edilen bulgular, birbirleriyle karşılaştırıldı. Ölçüm yapılan günlere göre çalışma gruplarının birbiriyle karşılaştırılmasıyla ilgili sonuçlar, Tablo 7-13'te verildi.

Çalışma gruplarında, ölçülen parametrelerin 0. gün değerleri karşılaştırıldıığında, gruplar arasında istatistiki bakımından, anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Tablo 7).

Tablo 7: Çalışma gruplarına ait "0. gün" değerlerinin karşılaştırılması (n:10)

Gruplar	Ağırlık (g)	İdrar Hacmi (ml)	Glukoz (mg/dl)
KONTROL	321 ± 8	10.6 ± 1.9	90 ± 10
MEL	315 ± 33	11.1 ± 3.6	81 ± 11
STZ	335 ± 27	8.5 ± 1.8	83 ± 10
STZ-MEL	350 ± 34	8.2 ± 1.4	85 ± 11

Çalışma gruplarına ait 1. ve 2.hafta değerleri, sırasıyla Tablo 8 ve Tablo 9’da gösterildi.

Tablo 8: Çalışma gruplarına ait “1. hafta” değerlerinin karşılaştırılması (n:5)

Gruplar	Ağırlık (g)	İdrar Hacmi (ml)
KONTROL	326 ± 12	9.0 ± 1.0
MEL	280 ± 21*	12.2 ± 3.8
STZ	276 ± 13*	20.8 ± 4.4** ^a
STZ-MEL	299 ± 32	18.0 ± 0.0** ^a

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu; a: MEL grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Çalışma grupları, 1.haftada elde edilen bulgulara göre karşılaştırıldığında, sadece kontrol grubuna göre MEL ve STZ gruplarında bulunan ratların önemli ölçüde zayıfladığı gözlemlendi. Buna karşılık, grupların idrar hacimleri karşılaştırıldığında, kontrol ve MEL grupları arasında fark olmadığı belirlendi. Bu gruplarla karşılaştırılan STZ ve STZ-MEL gruplarında ise, ratların önemli ölçüde daha fazla idrar çıkardıkları görüldü (Tablo 8).

Tablo 9: Çalışma gruplarına ait “2. hafta” değerlerinin karşılaştırılması (n:5)

Gruplar	Ağırlık (g)	İdrar Hacmi (ml)	Glukoz (mg/dl)
KONTROL	334 ± 12	9.8 ± 1.1	92 ± 8
MEL	292 ± 25	12.0 ± 3.4	80 ± 9
STZ	266 ± 17*	20.8 ± 3.6** ^a	331 ± 59** ^a
STZ-MEL	291 ± 31	17.6 ± 3.6*	282 ± 35** ^a

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu; a: MEL grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Tablo 9’da görüldüğü gibi, çalışma grupları, 2.haftada elde edilen bulgulara göre birbiriyle karşılaştırıldığında, ağırlık, idrar hacmi ve kan glukoz değerleri bakımından, kontrol ve MEL grupları arasında istatistiki bir farkın olmadığı belirlendi. Başka bir ifadeyle, ilk haftada zayıflayan MEL grubundaki ratların, ikinci haftada toparlandıkları görüldü. Bu gruplarla karşılaştırılan STZ ve STZ-MEL gruplarında kan glukoz düzeylerinin çok yükseldiği ve idrar çıkışlarının çok arttığı gözlemlendi. Diğer taraftan, STZ grubundaki ratların önemli ölçüde kilo kaybettikleri, STZ-MEL grubunda ise belirgin bir kilo kaybı olmadığı belirlendi.

Çalışma gruplarına ait 3. ve 4.hafta değerleri, sırasıyla Tablo 10 ve Tablo 11’de gösterildi.

Tablo 10: Çalışma gruplarına ait “3. hafta” değerlerinin karşılaştırılması (n:5)

Gruplar	Ağırlık (g)	İdrar Hacim (ml)
KONTROL	339 ± 10	10.0 ± 1.6
MEL	302 ± 28	12.0 ± 2.9
STZ	259 ± 11 ^{*,a}	21.2 ± 4.2 ^{*,a}
STZ-MEL	275 ± 29 [*]	20.8 ± 1.8 ^{*,a}

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu;
a: MEL grubu ile diğer grupların karşılaştırılması
sırasında elde edildi.

Çalışma grupları, 3. haftada elde edilen bulgulara göre karşılaştırıldığında, kontrol ve MEL gruplarında ölçülen parametrelerin birbirinden farklı olmadığı belirlendi. Bu gruplarla karşılaştırılan STZ ve STZ-MEL gruplarında, idrar hacimlerinin önemli ölçüde arttığı ve ratların kilo kaybettikleri tespit edildi. Ancak, bu gruplardaki rat ağırlıklarında gözlenen azalmanın, MEL grubuna göre, sadece STZ grubunda anlamlı olduğu bulundu (Tablo 10).

Tablo 11: Çalışma gruplarına ait “4. hafta” değerlerinin karşılaştırılması (n:5)

Gruplar	Ağırlık (g)	İdrar Hacmi (ml)	Glukoz (mg/dl)
KONTROL	346 ± 4	11.2 ± 0.8	88 ± 9
MEL	299 ± 26 [*]	11.6 ± 2.6	77 ± 7
STZ	240 ± 14 ^{*,a}	22.8 ± 2.7 ^{*,a}	286 ± 30 ^{*,a}
STZ-MEL	255 ± 33 [*]	20.8 ± 2.3 ^{*,a}	297 ± 58 ^{*,a}

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu; a: MEL grubu
ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Çalışma grupları, 4. haftada elde edilen bulgulara göre karşılaştırıldığında, kontrol ve MEL gruplarında ölçülen idrar hacmi ve glukoz değerleri bakımından fark olmadığı gözlemlendi. Bu gruplarla karşılaştırılan STZ ve STZ-MEL gruplarında, kan glukoz düzeylerinin çok yükseldiği ve idrar çıkışlarının çok arttığı gözlemlendi. Ağırlığa göre yapılan karşılaştırmalarda, kontrol grubuna göre diğer grupların hepsinde, MEL grubuna göre de sadece STZ grubunda anlamlı kilo kaybı olduğu belirlendi.

Çalışma gruplarına ait 5. ve 6. hafta değerleri, Tablo 12 ve Tablo 13'te gösterildi.

Tablo 12: Çalışma gruplarına ait "5. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:5)

Gruplar	Ağırlık (g)	İdrar Hacim (ml)
KONTROL	347 ± 10	11.6 ± 1.8
MEL	313 ± 26	12.2 ± 3.3
STZ	231 ± 12 ^{*,a}	23.4 ± 3.1 ^{*,a}
STZ-MEL	249 ± 27 ^{*,a}	17.8 ± 1.8 ^{*,a,b}

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu; a: MEL grubu; b STZ grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Çalışma grupları, 5. haftada elde edilen bulgulara göre karşılaştırıldığında, ağırlık ve idrar hacmi bakımından, kontrol ve MEL grupları arasında önemli bir fark olmadığı görüldü. Bu gruplarla karşılaştırılan STZ ve STZ-MEL gruplarında ise, ratların önemli ölçüde zayıfladığı ve idrar çıkışlarının arttığı gözlemlendi. İdrar hacmi bakımından, en büyük artışın STZ grubunda olduğu belirlendi (Tablo 12).

Tablo 13: Çalışma gruplarına ait "6. hafta" değerlerinin karşılaştırılması (n:10)

Gruplar	Ağırlık (g)	İdrar Hacmi (ml)	Glukoz (mg/dl)	A1C (%)
KONTROL	353±12	12.6±2.3	91±6	1.63±0.1
MEL	306±25*	12.6±2.5	90±10	1.53±0.1
STZ	216±19 ^{*,a}	23.1±2.5 ^{*,a}	297±67 ^{*,a}	3.9±0.5 ^{*,a}
STZ-MEL	235±21 ^{*,a}	22.7±2.2 ^{*,a}	292±56 ^{*,a}	3.6±0.2 ^{*,a}

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu; a: MEL grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Tablo 13'te görüldüğü gibi, çalışmanın sonunda, kontrol ve MEL grupları arasında rat ağırlığı dışında, idrar hacmi, glukoz ve A1C değerleri bakımından önemli bir fark olmadığı belirlendi. Bu gruplarla karşılaştırılan STZ ve STZ-MEL gruplarında, ratların anlamlı şekilde zayıfladığı, çok miktarda idrar çıkarttıkları ve glukoz ile A1C değerlerinin önemli ölçüde yükseldiği belirlendi.

BİYOKİMYASAL BULGULAR

Çalışma bitiminde, ratlardan elde edilen son plazma örneklerinde PCC ve tiyol düzeyleri; KC dokularında da PCC ve tiyol düzeylerinin yanı sıra, MGO seviyeleri ile GLO I ve GLO II aktiviteleri tayin edildi.

Çalışma gruplarının plazma PCC düzeyleri Tablo 14'te gösterildi.

Tablo 14'te görüldüğü gibi, $\mu\text{mol/L}$ veya nmol/mg protein cinsinden verilen PCC değerleri bakımından, kontrol ve MEL grupları arasında, anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Bu gruplarla karşılaştırılan STZ grubunda, $\mu\text{mol/L}$ PCC düzeylerinin önemli ölçüde yükseldiği bulundu. Ancak, STZ ile birlikte uygulanan MEL'in, STZ-MEL grubunda, plazma PCC değerlerini önemli ölçüde düşürdüğü belirlendi. Buna karşılık, protein başına verilen PCC değerleri bakımından, istatistiki önemi olmasa da, STZ grubunda PCC değerlerinin yükseldiği belirlendi.

Tablo 14: Çalışma gruplarını oluşturan ratların plazma PCC düzeyleri

Gruplar	PCC	
	($\mu\text{mol/L}$)	(nmol/mg protein)
KONTROL	$2,73 \pm 0,43$	$0,54 \pm 0,09$
MEL	$2,78 \pm 0,60$	$0,55 \pm 0,14$
STZ	$3,63 \pm 0,48^{*a}$	$0,74 \pm 0,24$
STZ-MEL	$2,47 \pm 0,61^b$	$0,51 \pm 0,19$

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu;
a: MEL grubu; b: STZ grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Çalışma gruplarının plazma tiyol düzeyleri Tablo 15'te gösterildi.

Tablo 15: Çalışma gruplarını oluşturan ratların plazma tiyol düzeyleri

Gruplar	TİYOL	
	($\mu\text{mol/L}$)	(nmol/mg protein)
KONTROL	$214,71 \pm 71,55$	$2,56 \pm 0,84$
MEL	$225,01 \pm 70,68$	$2,66 \pm 0,54$
STZ	$165,29 \pm 43,64$	$1,72 \pm 0,41^{*a}$
STZ-MEL	$206,98 \pm 46,27$	$1,94 \pm 0,40$

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu ve a: MEL grubu; ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Tablo 15'te görüldüğü gibi, $\mu\text{mol/L}$ veya nmol/mg protein cinsinden verilen tiyol değerleri bakımından, kontrol ve MEL grupları arasında, anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Kontrol ve MEL gruplarına göre, STZ grubunda tiyol düzeylerinin düştüğü; ancak bu düşüşün mg protein başına verilen tiyol değerlerinde istatistiki bakımdan önemli olduğu belirlendi. STZ-MEL grubunda ise, MEL etkisiyle, tiyol düzeylerinin kontrol değerlerine ulaştığı gözlemlendi.

Çalışma gruplarını oluşturan ratların KC dokularında tayin edilen PCC ve tiyol düzeyleri Tablo 16'da gösterildi.

Tablo 16: Çalışma gruplarını oluşturan ratlarda KC PCC ve tiyol düzeyleri

Gruplar	PCC (nmol/mg protein)	Tiyol (nmol/mg protein)
KONTROL	1.61 ± 0.52	$70,19 \pm 16,54$
MEL	1.58 ± 0.39	$63,04 \pm 17,07$
STZ	$3.02 \pm 0.83^{*,a}$	$39,12 \pm 7,51^{*,a}$
STZ-MEL	$1,61 \pm 0.40^b$	$58,42 \pm 6,96^b$

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu; a: MEL grubu; b: STZ grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Tabloya göre, doku PCC düzeyleri bakımından kontrol ve MEL grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Buna karşılık, STZ grubunda önemli ölçüde yükselen PCC düzeylerinin, STZ-MEL grubunda anlamlı derecede düştüğü; hatta kontrol ve MEL grubu değerlerine ulaştığı görüldü. Tiyol seviyelerinin, istatistiki önemi olmasa da, kontrol grubunda MEL grubuna göre daha yüksek olduğu; bu gruplarla karşılaştırıldığında, STZ grubunda anlamlı ölçüde azaldığı ve STZ-MEL grubunda ise yükselerek, kontrol ve MEL grubu değerlerine yaklaştığı belirlendi (Tablo 16).

Çalışma gruplarının KC dokusunda ölçülen MGO düzeyleri Tablo 17'de verildi.

Tablo 17: Ratların KC dokusunda ölçülen MGO düzeyleri

Gruplar	MGO (nmol/mg protein)
KONTROL	1.41 ± 0.27
MEL	1.44 ± 0.31
STZ	$3.34 \pm 0.43^{*,a}$
STZ-MEL	$2,12 \pm 0.26^{*,a,b}$

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu; a: MEL grubu; b: STZ grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

Tablo 17’de verildiği gibi, kontrol ve MEL grupları karşılaştırıldığında, MGO değerleri bakımından; iki grup arasındaki farkın önemli olmadığı belirlendi. Kontrol ve MEL grubuyla karşılaştırılan STZ grubunda, MGO düzeyleri anlamlı şekilde daha yüksek bulunurken; STZ-MEL grubunda da MGO değerlerindeki artış, istatistiki bakımdan anlamlı bulundu. STZ ve STZ-MEL grupları karşılaştırıldığında, MEL’in etkisiyle MGO düzeylerinin düştüğü, ancak kontrol grubu değerlerine ulaşamadığı gözlemlendi.

Çalışma gruplarının KC dokusunda ölçülen GLO I ve GLO II aktiviteleri Tablo 18’de verildi.

Tablo 18: Ratların KC dokusunda ölçülen GLO I ve GLO II aktiviteleri

Gruplar	GLO I (Ü/mg protein)	GLO II (Ü/mg protein)
KONTROL	0,084 ± 0.017	0,049 ± 0.018
MEL	0,095 ± 0.02	0,051 ± 0.018
STZ	0,061 ± 0.019 ^a	0,024 ± 0.008 ^{*,a}
STZ-MEL	0,074 ± 0.044	0,054 ± 0.018 ^b

İstatistiksel olarak anlamlı bulgular: *: Kontrol grubu; a: MEL grubu; b: STZ grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sırasında elde edildi.

GLO I ve GLO II aktivitesi bakımından karşılaştırılan kontrol ve MEL grupları arasında istatistiki fark olmadığı belirlendi. Bu gruplarla karşılaştırılan STZ grubunda GLO II aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü, GLO I aktivitesinin ise sadece MEL grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiği gözlemlendi. Diğer taraftan STZ-MEL grubunda GLO II aktivitesinin kontrol ve MEL grubu düzeylerine ulaştığı belirlendi (Tablo 18).

TARTIŞMA

DM komplikasyonlarının gelişiminde en önemli risk faktörü olarak kabul edilen hipergliseminin, hangi patolojik mekanizmalarla ve hangi sistemleri etkileyerek bu komplikasyonlara neden olduğu halen tartışılmaktadır. Gelişen DM komplikasyonlarını açıklamak üzere AGE oluşumu, aldoz redüktaz hipotezi, oksidatif stres, redüktif stres, karbonil stres, değişmiş lipoprotein metabolizması, artmış protein kinaz C aktivitesi, büyüme faktörleri ve sitokin aktivitelerinin değişimi gibi öne sürülen birçok mekanizma olmasına rağmen; çoğunun birbiriyle örtüşmesi ve DM fizyopatolojisinin çok karmaşık olması nedeniyle, deneysel diyabet modelleri giderek önem kazanmakta ve bu alanda yapılan bir çok araştırmanın temelini oluşturmaktadır (1,3,33). Bu hastalığın anlaşılmasında kullanılan deneysel modeller insan diyabetinin geliştiği gerçek koşulları karşılamasa da, oluşan diyabetik durumun biyokimyasal, hormonal ve morfolojik olarak gösterilebilmesi bakımından oldukça avantajlıdır (21).

Diyabet modeli olarak, başta ratlar olmak üzere bir çok hayvan kullanılmakta (18) ve diyabetik ajan olarak da genellikle STZ (20,21) gibi kimyasallarla β hücreleri harap edilerek diyabet oluşturulabilmektedir (19). Ratlarla yapılan deneysel çalışmalarda *iv* ya da *ip* olarak tek seferde kullanılan STZ dozu, 40 ila 60 mg/kg arasında değişmekle beraber; 40 mg/kg'ın altındaki tek doz kullanımlarda, STZ'nin etkisiz olduğu;

yüksek dozlarda da insülin şoku nedeniyle ölüm oranının çok artabileceği bildirilmektedir (23).

Bu çalışmada da ratlar üzerinde STZ diyabeti oluşturulması tercih edildiğinden, STZ dozunu belirlemek amacıyla yapılan ön çalışmada, literatüre benzer şekilde, 60 mg/kg STZ ile ratların yaşatılamaması ve glukoz takviyesine gerek duyulması nedeniyle, çalışmada tek doz 50 mg/kg STZ ile diyabet oluşturuldu.

Deneysel diyabette gözlenen olumsuzluklar, aşırı ağırlık kaybı ve pankreasın totale yakın yıkımına bağlı gelişen diyabetik ketoasidozdur. Bu nedenle kronik deneysel diyabet (9) oluşturulması esnasında bazı araştırmacılar, diyabet yapılan ratların uzun süreli takibinde, hem aşırı ağırlık kaybını hem de diyabetik ketoasidozu önlemek için haftada üç gün 2 Ü dozunda sc insülin uygulamaktadırlar (59,60). Bu çalışmada da diyabet oluşturulan ratlara haftada üç gün 2 Ü dozunda sc insülin uygulandı.

Ratlarda normalde 35-50 mg/dl olan kan glukoz düzeyleri, diyabet oluşumuyla 200 mg/dl veya daha da üzerine çıkabilmektedir (20, 21). STZ uygulamasını takiben ilk 24 saatte yükselmeye başlayan kan glukoz değerleri 7. günde pik düzeylere ulaşır (61,62).

Bu çalışmada da STZ uygulamasını takiben üçüncü günde 200 mg/dl'nin üzerine çıkan ratların kan glukoz düzeyleri, çalışma boyunca on beş gün aralarla takip edildi ve değerlerin hep hiperglisemik düzeyde seyrettiği gözlemlendi. Ayrıca, her hafta toplanan idrar örneklerinde de glukoz kontrolü yapılarak, haftalık diyabet takibi yapılmış oldu.

Diyabet oluşumunu takiben, bu semptomlara ilaveten, ratların giderek zayıfladığı görüldü. Bu durum, literatürde ratlarda oluşan dehidratasyona ve yağ kütlesinin kaybına bağlı olarak açıklanmakta, insülin eksikliğinde aktive olan hormona duyarlı lipaz, adipoz dokunun hızla yıkılmasına ve serbest yağ asitlerinin birikimine yol açmakta; lipoliz hızındaki bu artış, kilo kaybı şeklinde kendini göstermektedir (22).

Deneyisel çalışmalarda diyabetin uzun süreli etkilerini daha iyi gözlemleyebilmek için en az altı hafta izlenen deney hayvanlarında kronik diyabet gelişmekte ve oluşan diyabetin glisemik takibinde A1C ölçümü faydalı bir parametre haline gelmektedir (63).

Günümüzde A1C ölçümü için otuzdan fazla metot bulunmaktadır. Bu nedenle benzer şekilde planlanan deneysel çalışmalarda, metodolojik farklılıklardan dolayı, A1C yönünden kıyaslama yapmak zorlaşmaktadır.

Hagiwara ve ark (64), 90 mg/kg STZ ile diyabet yapılan ratlarda 21.gün sonunda DCA 2000 sistemi ile ölçülen A1C düzeylerini; kontrolde % <2.5; STZ grubunda %5.26; STZ+insülin grubunda ise %2.65 bulmuşlardır.

Vallejo ve ark. (65), 60 mg/kg STZ uygulanan ratları altı haftanın sonunda sakrifiye ettiklerinde, immünotürbidimetrik yöntemle ölçtükleri A1C değerlerini kontrol grubunda % 4, diyabetiklerde ise %11,4 bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde, Kedziora ve ark (66)'nın yaptıkları deneysel diyabetin 6. haftasında % A1C değerlerini kontrol grubunda % 2.1, STZ uygulanan grupta ise % 4.3 bulmuşlardır. Aynı çalışmada diyabet grubuna eklenen aminoguanidinin % A1C seviyeleri üzerinde anlamlı bir etkisi bulunamamıştır.

Diyabet komplikasyonlarının patogeneziyle ilişkili mekanizmalar dikkate alındığında, farklı temellere dayanan bu mekanizmaların birbiri ile örtüştüğü görülmektedir. AGE oluşumunun oksidatif strese neden olmasının yanı sıra oksidatif stresin de AGE oluşumunu hızlandırması; oksidatif stres sonucu oluşan MDA gibi lipid peroksidasyonu ürünlerinin aynı zamanda bir RCC olması ve bu nedenle karbonil strese de yol açması (33) gibi durumlar göz önüne alındığında, diyabet fizyopatolojisinin karmaşıklığı daha da belirgin hale gelmektedir.

Günümüzde, serbest radikallerin etkisiyle; karbohidrat, lipid, protein gibi biyolojik moleküller, membranlar ve dokularda meydana gelen oksidasyonunun, birçok

patolojik olayın gelişiminde önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir (27). DM komplikasyonlarının gelişiminde rol oynadığı öne sürülen karbonil stres, oksidatif stres ve EAGLE oluşumu gibi mekanizmaların tümünde, serbest radikallerin rol oynadığı bilinmektedir (1,33).

Farklı biyomoleküllerden farklı reaksiyonlarla oluşan, kimyasal yapı olarak birbirinden önemli farklılıklar gösteren, tek ortak noktaları yapılarında bir veya daha fazla karbonil grubu (C=O) taşımak olan, çok sayıdaki RCC bileşiğinden hangisinin, AGE oluşumundan; dolayısıyla da patolojik tabloların gelişiminden, sorumlu olduğunu kesin olarak belirlemek oldukça güçtür.

MGO, Maillard reaksiyonu esnasında üretilen ve glikolitik ara ürünlerden türeyen, fizyolojik bir α -dikarbonil bileşiği olmasının yanı sıra, glioksalaz sisteminin de fizyolojik substratıdır. Redükte glutasyonu kofaktör olarak kullanan bu sistemde MGO, SLG ara ürünleri vasıtasıyla D-Laktata dönüştürülür (38).

Normal şartlarda vücutta MGO oluşum oranı çok düşük olmasına rağmen; patolojik durumlarda insan plazma MGO düzeyi, 100-500 kat yükselebilmektedir (67).

İntraselüler ve ekstraselüler AGE'ler için başlıca prekürsör olduğu (55) bilinen MGO'nun; DM hastalarında yükseldiği (68) bildirilmektedir. Beisswenger ve ark. (69)'nın Tip 2 diyabetik hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada, diyabet grubundaki MGO düzeylerinin kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunduğu bildirilmektedir. Bu *in vivo* çalışmaların yanı sıra, früktoz, D-gliseraldehit, dihidroksiaseton, aseton ve hidroksiasetonun insan eritrosit kültürlerine ilavesiyle ve hiperglisemik şartlar altında MGO oluşum oranının arttığı da belirlenmiştir (70).

Nemet ve ark. (71) tarafından, Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastaların MGO tam kan ve plazma düzeyleri karşılaştırıldığında; her iki diyabetik grupta da yüksek bulunan tam kan ve plazma MGO düzeylerinin, sadece plazmada istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde STZ diyabeti oluşturulan ratların böbrek, lens

ve kan örneklerinde MGO düzeyleri yüksek bulunmuştur (72). Buna karşılık Ohmori ve ark (73), alloksan uygulamasını takiben 72 saat sonra ratların KC dokularında MGO düzeylerinin düşük, iskelet kasında ise yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Literatürde doku MGO ile ilgili farklı sonuçların bulunması, metodolojik farklılıkların yanı sıra, doz ve süre gibi deneysel diyabet şartlarına da bağlanabilir. Bu çalışmada ise diyabetik rat grubunda KC doku MGO düzeyleri yüksek bulunmuştur. Uygulanan STZ dozunun yüksekliği (50 mg/kg) ve kronik diyabete karşılık gelen altı hafta gibi uzun bir çalışma süresi nedeniyle, KC MGO seviyelerinin yükselmesi beklenebilir.

Diğer taraftan organizmada hemen hemen her dokuda yaygın olarak bulunan ve MGO'nun detoksifikasyonunu katalizleyen glioksalaz sistemi de MGO düzeylerini etkileyebilir. Bu detoksifikasyon sisteminin herhangi bir şekilde baskılanması, MGO düzeylerinin yükselmesinden sorumlu olabilir.

Literatürde GLO I ve GLO II aktiviteleri üzerine diyabetin etkisini araştıran bir çok çalışma mevcut olmasına rağmen, bu çalışmalardan elde edilen bulgular, farklılık göstermektedir. Diyabetik ratlarda ince bağırsak (74), lens (75), böbrek (76), KC (77) dokularında GLO I aktivitesi normal bulunurken; GLO I aktivitesini iskelet kasında yüksek (72) ve KC'de düşük (72,78) bulan çalışmalar da vardır. Benzer şekilde, GLO II aktivitesi de ince bağırsakta normal (74), iskelet kasında yüksek (72), ya da böbrek (76) ve KC (72) dokularında düşük bulunmuştur.

Bu çalışmada ise, mevcut literatürün bir kısmıyla uyumlu olarak, diyabetik ratların KC dokusunda hem GLO I hem de GLO II aktivitelerinin düştüğü belirlendi. Bu bulguların kısmen de olsa MGO düzeylerindeki artışı desteklediği düşünülebilir.

Diyabetik ratlarda glioksalaz sisteminin baskılanması, fizyolojik substratları olan MGO'nun kendisi ya da kofaktörü olan GSH ile ilişkilendirilebilir.

MGO'nun bu sistem üzerindeki baskılayıcı etkisi;

- SOR üretimine neden olarak GSH tüketimine yol açması (79),
- GSH-Px, SOD, GSSG-Rd gibi çeşitli antioksidan enzimleri modifiye ederek aktivite kaybına neden olması (38),
- Protein yapısındaki amino asitlerle reaksiyona girerek MGO radikal anyonu, çapraz bağlanmış radikal katyonu ve süperoksit anyonu (O₂ varlığında) gibi farklı tipte radikal üretimine neden olması (80),
- Hatta *in vitro* şartlarda yüksek miktarlarıyla GLO II aktivitesini baskılaması (57),

gibi farklı mekanizmalarla açıklanabilir.

Farelere verilen MGO'nun (100 mg/kg) doza bağımlı bir şekilde, GLO I ve II aktivitelerini azaltması da (79), yukarıda öne sürülen mekanizmaların *in vivo* şartlarda da gerçekleşebileceğini düşündürülebilir. MGO varlığında (100/200 µM), insan nöroblastoma ve glioblastoma hücrelerinde glioksalaz I ve II aktivitelerinin ve GSH düzeylerinin azalması, ayrıca SOR üretiminin belirgin şekilde artması (81) da; glioksalaz sisteminin inhibisyonu ile oksidatif stres oluşacağını göstermektedir.

Yukarıda sıralanan etkiler göz önüne alındığında, diyabetik şartlarda bir kez yükselen MGO düzeylerinin, adeta kısır bir döngü şeklinde, kendisini yıkan sistemleri bozarak, daha da yüksek düzeylere ulaşabileceği düşünülebilir.

İntraselüler ortamın başlıca tiyol bileşiği olan GSH (27), sahip olduğu pek çok antioksidan fonksiyonun yanı sıra glioksalaz sisteminde de kofaktör olarak rol oynamaktadır. Karaciğerde gerçekleşen MGO metabolizması sırasında, meydana gelen redoks siklusunun aynı zamanda SOR üretimine neden olabileceği iddia edilmiştir (79). Ortamdaki GSH düzeylerinde olabilecek herhangi bir azalmanın, GLO sistemini de olumsuz etkilemesi kaçınılmazdır.

Diyabetik ratlarda lens (72), böbrek (9) ve KC (9, 72) dokularında ve farelerin KC dokularında (82) tiyol düzeylerinin düştüğünü gösteren çalışmalar; diyabetik

şartlarda tiyol stresin varlığını göstermesi bakımından önemlidir. Benzer şekilde diyabetik ratlarda plazma tiyol seviyelerinin de azaldığı gösterilmiştir (83). Bu çalışmada da literatürle uyumlu olarak, plazmada istatistiki önemi olmasa da, hem KC hem plazma tiyol seviyelerinin düştüğü belirlendi.

Plazmanın başlıca antioksidan molekülü ve tiyol kaynağı kabul edilen albüminin (58), yedi gün boyunca *in vitro* 1 mM MGO ile 37°C de inkübasyonu; yapısında bulunan tiyol gruplarının % 40'ının kaybına ve antioksidan kapasitesinin azalmasına neden olmuştur (84).

Plazmada serbest tiyol kaynağı olan albüminin, diyabetik hastalarda oksidatif strese uğrayan başlıca protein olduğu dikkate alındığında (85), total tiyol seviyelerinde diyabetik grupta saptanan azalış, diyabetik şartlarda üretilen oksidantlara karşı yapılan savunmada tiyolün tüketilmesine bağlı olabilir.

Bu nedenle yükselen MGO düzeylerinin karbonil ve tiyol stresin yanı sıra oksidatif strese de başka bir ifadeyle protein oksidasyonuna da yol açtığı söylenebilir.

Literatürde protein oksidasyonunun başlıca göstergesi olan PCC düzeylerinin, MGO varlığında arttığını gösteren birçok çalışma vardır.

Sığır lens proteinlerinin 25 mM MGO, askorbik asit, glioksal ile 2 hafta ve 0.5 M früktoz ile 6 hafta süreyle 37°C de inkübe edilmesi; tiyol gruplarında azalma ve PCC düzeylerinde artma ile sonuçlanmıştır. En yüksek PCC düzeylerinin MGO ile inkübe edilen lens proteinlerinde meydana gelmesi, MGO'nun protein karbonilasyonuna neden olan en zararlı RCC olduğu fikrini doğurmuştur (86). Benzer şekilde diğer bir *in vitro* çalışmada da, MGO'ya maruz bırakılan ovalbüminin, PCC içeriğinin arttığı ve yüksek molekül ağırlıklı polipeptidlerin oluştuğu gösterilmiştir (87).

Tip 1 DM'li hastaların plazmasında (88) ve Tip 2 diyabetiklerin eritrositlerinde (89), PCC değerleri yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde literatürde de diyabetik ratlarda KC PCC düzeylerinin yüksek bulunması(90); oksidatif, karbonil ve tiyol stres ile MGO gibi prekürsörlerden AGE oluşumu arasındaki ilişkiyi güçlendirmektedir.

Farmakolojik olarak AGE oluşumu aminoguanidin, tenilsetam gibi bileşiklerle önlenirse de; bu bileşiklerin pek çok istenmeyen yan etkiler göstermesi, kullanımlarını sınırlamaktadır (5). Diğer taraftan, SOR'un organizmada şekerleri oksitleyerek AGE oluşumuna neden olduğu gösterildiğinden (1,5,6); AGE oluşumunun önlenmesinde antioksidanların da kullanılabilceği öne sürülmektedir.

Vitamin E, alfa-lipoik asit, dimetilsülfoksit gibi antioksidanların hiperglisemi ile indüklenen SOR ve AGE oluşumunu *in vitro* şartlarda önleyebildiği gösterilmiştir (6).

AGE oluşumunun önlenmesinde kullanılacak ideal bir ajanın, teorik olarak hem antioksidan özellikte olması hem de RCC bileşiklerinin etkisini önlemesi gerekir. Ayrıca, bu ideal ajanın membranlardan geçerek AGE oluşumunun gerçekleştiği bölgelere kolayca ulaşabilmesi, endojen olması ve hepsinden önemlisi belirgin bir toksisite göstermemesi de istenir.

Hem lipofilik hem de hidrofilik özellik gösteren ve endojen bir molekül olan melatonin, yukarıda sıralanan özelliklerin çoğuna sahiptir. Bu nedenle patogenezinde AGE'lerin rol oynadığı hastalıkların tedavisinde, melatonin ideal bir anti-AGE bileşiği olarak kullanılabilceği görüşü gün geçtikçe önem kazanmaktadır (8,43).

Pineal bez hormonu olan MEL'in endokrin fonksiyon ve sirkadiyen ritim üzerine bilinen etkilerinden başka; *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla, antioksidan aktiviteye de sahip olduğu gösterilmiştir. Hatta, antioksidanlar içerisinde MEL'in en güçlü radikal

tutucu olduğu öne sürüldüğünden, MEL'e olan ilgi giderek artmakta ve MEL'in antioksidan özelliği gün geçtikçe önem kazanmaktadır (8).

MEL'in AGE oluşumu üzerine etkisi henüz bilinmemekle beraber, diyabetik ratlarda oksidatif hasarı önleyebildiği ve organizmayı diyabetin olumsuz etkilerinden koruyabildiği bildirilmiştir (9, 10).

Literatürde STZ diyabeti oluşturulan ratlarda MEL'in koruyucu etkisini gösteren bir çok çalışma mevcuttur. Bunların içerisinde büyük bir kısmında diyabetik ratlarda düşük bulunan GSH seviyeleri ile SOD, GSH-Px ve katalaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinin MEL etkisiyle yükselerek normal düzeylere ulaştığı bildirilmektedir. Diğer taraftan, oksidatif stres markeri olarak tayin edilen ve diyabetik ratlarda yüksek bulunan lipid hidroperoksit ve MDA gibi parametrelerin, MEL varlığında normal düzeylere düştüğü bildirilmektedir (9,10,82,83).

Bu çalışmada da diyabetik ratların plazma ve KC'inde düşük bulunan tiyol düzeylerinin, MEL varlığında yükseldiği gözlenmiştir. Ayrıca, STZ diyabeti oluşturulan ratlara 42 hafta boyunca uygulanan MEL'in, diyabetik ratlarda yüksek bulunan plazma ve KC dokusu PCC düzeylerini düşürdüğü; benzer şekilde kronik diyabetin etkisiyle yükselen doku MGO düzeylerini düşürerek normale yaklaştırdığı gözlenmiştir. Buna karşılık, diyabetik ratların KC'inde baskılandığı belirlenen glioksalaz sisteminin, MEL varlığında korunduğu; başka bir ifadeyle, GLO I aktivitesinde daha belirgin olmakla beraber, hem GLO I ve hem de GLO II aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir.

Literatür taraması yapıldığında, klinik veya deneysel olarak diyabetik şartlarda PCC ve MGO-glioksalaz sistemi ile melatonin etkileşimini inceleyen *in vivo* veya *in vitro* bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Ulaşılabilen literatür bilgisine göre, diyabetik şartlarda MEL'in PCC, MGO ve glioksalaz sistemi üzerine etkileri ilk defa bu çalışmada araştırılmaktadır.

Çok iyi bilinen antioksidan özelliklerine ilaveten, bu çalışma ile MGO ve PCC değerleri üzerinden MEL'in antiplikasyon etkiye de sahip olduğunun gösterilmesi, literatüre önemli katkıda bulunabilir.

Bu çalışmanın tüm bulguları literatürle birlikte değerlendirildiğinde; STZ ile oluşturulan diyabet modelinde, yüksek PCC ve düşük tiyol düzeyleriyle yansıtıldığı gibi, diyabetik şartlarda oksidatif, karbonil ve tiyol stresin oluşması; yüksek MGO düzeylerinin yanı sıra, GLO detoksifikasyon sisteminin baskılanmış bulunması diyabette AGE oluşumunun kaçınılmaz olduğunu göstermektedir. Oldukça kompleks, birbirleri ile girift etkileşimler gösteren bu patojenik mekanizmaların önlenmesinde; diyabetik hastalar tarafından MEL gibi geniş spektrumlu, non-toksik ve endojen bir molekülün kullanımı önerilebilir.

SONUÇLAR

Tek doz 50 mg/kg STZ ile diyabet oluşturulan ratlarda, oksidatif ve karbonil stresin varlığını gösterebilmek ve MEL'in bu mekanizmalarla etkileşimini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, aşağıda sıralanmıştır:

- Tek doz *ip* SF verilen kontrol grubu ratlarında ölçülen kan glukozu ve idrar hacmi değerlerinin çalışma süresince değişmediği; sadece ratların ağırlığının giderek arttığı ve bu artışın dördüncü haftadan itibaren anlamlı olduğu; çalışma sonunda ratların ağırlığında % 8,3 oranında bir artış olduğu belirlendi (Tablo 3).
- 42 gün süreyle *ip* MEL uygulanan grupta, kontrol grubuna benzer şekilde, çalışma süresince kan ve idrar değerlerinde bir değişiklik olmadığı; rat ağırlığının ise çalışma bitiminde % 5 oranında arttığı gözlemlendi (Tablo 4).
- STZ uygulamasını takip eden 3. günde STZ ve STZ-MEL gruplarında kan glukoz düzeyleri 200 mg/dl'nin üzerinde bulundu ve çalışma süresince hipergliseminin devam ettiği ve yüksek kan glukoz değerlerinin istatistiki bakımdan anlamlı olduğu görüldü (Tablo 5 ve Tablo 6).
- STZ ve STZ-MEL gruplarında, diyabet oluşumunu takiben, çalışma süresince ratların idrar hacmindeki artışın istatistiki bakımdan anlamlı olduğu belirlendi. Ratlarda STZ uygulamasıyla başlayan kilo kaybındaki haftalık değişimlerin istatistiki bakımdan anlamlı olduğu bulundu (Tablo 5 ve Tablo 6).
- Çalışma gruplarından her hafta toplanan 24 saatlik idrar örneklerinde triple bakılan glukoz sonuçları değerlendirildiğinde; çalışma süresince kontrol ve MEL gruplarını oluşturan ratların idrarında glukoz olmadığı tespit edildi. Buna karşılık, hem STZ ve hem de STZ-MEL gruplarında, STZ uygulamasını takip eden üçüncü günden başlayarak, çalışmanın sonuna kadar, idrar glukoz değerleri, +3 veya +4 pozitif olarak değerlendirildi.

- Çalışma gruplarında ölçülen parametrelerin 0. gün değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiki bakımından anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Tablo 7).
- Çalışma grupları, 1.haftada elde edilen bulgulara göre karşılaştırıldığında, sadece kontrol grubuna göre MEL ve STZ gruplarındaki ratların önemli ölçüde zayıfladığı gözlemlendi. İdrar hacimleri bakımından kontrol ve MEL grupları arasında fark olmadığı, STZ ve STZ-MEL gruplarında ise, ratların daha fazla idrar çıkardıkları belirlendi (Tablo 8).
- Kontrol ve MEL grupları arasında 2-5. haftalarda ölçülen ağırlık, idrar hacmi ve kan glukozu bakımından, istatistiki bir farkın olmadığı belirlendi. Aynı süre içerisinde, bu gruplarla karşılaştırılan STZ ve STZ-MEL gruplarında, kan glukoz düzeylerinin çok yükseldiği ve idrar çıkışlarının çok arttığı gözlemlendi. STZ grubundaki ratların önemli ölçüde kilo kaybettikleri belirlendi (Tablo 9-12).
- Çalışmanın sonunda, kontrol ve MEL grupları arasında rat ağırlığı dışında, idrar hacmi, glukoz ve A1C değerleri bakımından önemli bir fark olmadığı belirlendi. Bu gruplarla karşılaştırılan STZ ve STZ-MEL gruplarında, ratların anlamlı şekilde zayıfladığı, çok miktarda idrar çıkarttıkları ve glukoz ile A1C değerlerinin önemli ölçüde yükseldiği gözlemlendi (Tablo 13).
- Plazma ve KC dokusu PCC değerleri bakımından, kontrol ve MEL grupları arasında fark olmadığı belirlendi. STZ grubunda, PCC düzeylerinin önemli ölçüde yükseldiği; STZ-MEL grubunda ise STZ ile birlikte uygulanan MEL'in, plazma ve doku PCC değerlerini önemli ölçüde düşürdüğü, hatta kontrol ve MEL grubu değerlerine yaklaştırdığı görüldü (Tablo 14 ve Tablo 16).
- Kontrol ve MEL grupları arasında, plazma ve doku tiyol düzeyleri bakımından anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. STZ grubunda tiyol düzeylerinin düştüğü; STZ-MEL grubunda ise, MEL etkisiyle yükselerek, kontrol değerlerine ulaştığı gözlemlendi (Tablo 15 ve Tablo 16).
 - Kontrol ve MEL grupları arasında, doku MGO ile GLO I ve GLO II aktiviteleri bakımından anlamlı bir fark olmadığı bulundu. STZ grubunda, MGO düzeyleri anlamlı şekilde daha yüksek bulunurken; GLO II aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü, GLO I aktivitesinin ise sadece MEL grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiği gözlemlendi. STZ-MEL grubunda da MGO değerlerindeki artış, istatistiki bakımından anlamlı bulundu. STZ ve STZ-MEL grupları karşılaştırıldığında, MEL'in etkisiyle MGO düzeylerinin düştüğü, ancak kontrol grubu değerlerine ulaşamadığı gözlemlendi. Diğer taraftan STZ-MEL grubunda GLO II aktivitesinin kontrol ve MEL grubu düzeylerine ulaştığı belirlendi (Tablo 17 ve Tablo 18).

KAYNAKLAR

1. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes* 1999;48:1-9.
2. Feillet-Coudray C, Rock E, Coudray C, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clin Chim Acta* 1999;284:31-43.
3. Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;67:3-21.
4. Martins AM, Mendes P, Cordeiro C, Freire AP. In situ kinetic analysis of glyoxalase I and glyoxalase II in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Eur J Biochem* 2001;268:3930-6.
5. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. Ages and their interaction with AGE-reseptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 1998;37:586-600.
6. Thorpe S, Baynes J. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs Aging* 1996;9:69-77.
7. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995;19:227-50.
8. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17:347-57.

9. Maritim AC, Moore BH, Sanders RA, Watkins JB. Effect of melatonin on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Toxicol* 1999;18:161-6.
10. Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I, Laborit H. Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993;80:211-23.
11. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005;28:37-42.
12. Sherwin RS. Diabetes mellitus. In: Goldman L, Bennet J (eds), *Cecil Textbook of Medicine* (21sted). WB Saunders Company, Philadelphia 2000, pp. 1263-85.
13. Wild S, Sicre R, Roglic G, King H, Green A. Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.
14. Dods RF. Diabetes Mellitus In:Kaplan LA. Pesce AJ (eds) *Clinical Chemistry, Theory, Analysis, Correlation*. Mosby Company, St. Louis 1996, pp. 613-41.
15. Satman İ, Sargın M, Yılmaz T, et al. Population-based study of diabetes in Turkey. *Diabetes Care*. 2002;25:1551-6.
16. Çetin M, Keleştimur F, Paşaoğlu H, Çoksevım B, Köker AH: Kayseri bölgesi kentsel popülasyonda diabetes mellitus prevalansı. 1995 Ulusal Diyabet Kongresi ve İnsülinin Keşfine Doğru 75.Yıl Sempozyumu.
17. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. (3rd Ed) WB Saunders Company, Philadelphia 1999.
18. Friedman EA. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1999;22:65–71.
19. Satav JG, Katyare SS. Effect of STZ-induced diabetes on oxidative energy metabolism in rat liver mitochondria-a comparative study of early and late effects. *Ind J Clin Biochem* 2004;19:23-31.
20. Carvalho EN, Carvalho NAS, Ferreiro LM. Experimental model of induction of diabetes mellitus rats. *Acta Cir Bros* 2003;18:60-4.
21. Islas S, Monsalve CR, Pena JE et al. STZ and alloxan experimental diabetes: comparison of the two models in rats. *Acta Histochem Cytochem* 2000;33:201-8.

22. Çelik S, Bal R. Köpek ve kedilerde diabetes mellitus:böbrek fonksiyon bozuklukları ve idrar taşı oluşumu ile ilişkisi. *Uludag Univ J Fac Vet Med* 2002;21:43-8.
23. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536-46.
24. [Http://Www.Medicine.Uiowa.Edu/Frrb/Virtualschool/Studentpapers/Freeradi calsp01/Paper%204/Lil-Paper4.Pdf](http://Www.Medicine.Uiowa.Edu/Frrb/Virtualschool/Studentpapers/Freeradi calsp01/Paper%204/Lil-Paper4.Pdf)
25. <http://Www.Cancercare.on.Ca/Pdfdrugs/STREPTOZ.Pdf>
26. Holstad M. Prevention of Type 1 Diabetes Mellitus in Experimental Studies. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy (Faculty of Medicine) in Medical Cell Biology. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1014. 2001, 48 pp. Uppsala ISBN 91-554-4972-7.
27. Sies H. Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82: 291-5.
28. Valdez LB, Arnaiz SL, Bustamante J, et al. Free radical chemistry in biological systems. *Biol Res* 2000;33:1-8.
29. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313-16.
30. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 1997;10:485-94.
31. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1151-63.
32. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899: 191-208.
33. Lyons TJ. Glycation, carbonyl stress, EAGLES, and the vascular complications of diabetes. *Semin Vasc Med* 2002;2:175-89.
34. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357-63.
35. ACE Guidelines for Glycemic Control. *Endocr Pract* 2002;8:5-11.
36. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005;24:55-99.

37. Himmelfarb J, McMonagle E, McMennamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58:2571-8.
38. Kalapos MP. Methylglyoxal in living organisms, chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett* 1999;110:145-75.
39. Vander Jact D, Hassebrook RK, Hunsaker LA, Brown WM, Royer RE. Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal and by glyoxalase-I: Roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. *Chem Biol Interac* 2001;130-132:549-62.
40. Thornally PJ. Glutathione-dependent detoxification of α -oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem Biol Interact* 1998;111-112:137-51.
41. Lo TW, Westwood ME, Mclellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N-alpha-acetylarginine, N-alpha-acetylcysteine, and N-alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem* 1994;269:32299-305.
42. Meade SJ, Miller AG, Gerrard JA. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. *Bioorgan Med Chem* 2003;11:853-62.
43. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 2000;7:444-58.
44. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997;336:186-95.
45. Ianas O, Olivescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. *Rom J Endocrinol* 1991;29:117-23.
46. Aras K, Erşen G. *Klinik Biyokimya.. AÜ Basımevi, Ankara* 1975, pp.17-18.
47. Degirmenci İ, Üstüner MC, Kalender Y, Kalender S, Günes HV. The Effects of acarbose and rumex patientia l. on ultrastructural and biochemical changes of pancreatic β cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2005;97:555-9.
48. Wakame K. Protective effect of active hexose correlated compound onset of diabetes induced by streptozotocine in the rat. *Biomed Res* 1999;20:145-52.

49. Kayalı R, Çakatay U, Telci A, et al. Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:315-21.
50. Soriano FG, Pacher P, Mabley J, Liauder L, Szabo C. Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase. *Circ Res* 2001;89:684-91.
51. Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res* 2001;31:193-8.
52. Amiri F, Garcia R. Renal angiotensin II receptors and protein kinase C in diabetic rats: effects of insulin and ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:603-12.
53. Forster MJ, Sohal BH, Sohal RS. Reversible effects of long term caloric restriction on protein oxidative damage. *Gerontol.* 2000;55:522-29.
54. Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CH. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2000;42:361-71.
55. Cooper RA. Methylglyoxal synthase. *Methods Enzymol* 1975;41:502-8
56. Mannervick B, Ridderstrom M. Catalytic and molecular properties of glyoxalase I. *Biochem Soc Trans* 1993;21:515 –17.
57. Racker E. The mechanisms of action of glyoxalase. *J Biol Chem* 1951;190:685-96.
58. Hu ML, Locie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993;121:257-62.
59. Fox A, Eastwood C, Gentry C, Manning D, Urban L. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain* 1999 ;81:307-16.
60. Gupta BL, Preet A, Baquer NZ. Protective effects of sodium orthovanadate in diabetic reticulocytes and ageing red blood cells of wistar rats. *J Biosci* 2004;29:73-9.
61. Newby FD, Bayo F, Thacker SV, Sykes M, Digirolamo M. Effects of streptozotocin-induced diabetes on glucose metabolism and lactate release by

- isolated fat cells from young lean and older, moderately obese rats. *Diabetes*. 1989;38:237-43.
62. Gallego M, Setien R, Izquierdo MJ, Casis O, Casis E. Diabetes-induced biochemical changes in central and peripheral catecholaminergic systems. *Physiol Res* 2003;52:735-41.
63. Bidasee KR, Nallani K, Yu Y, et al. Chronic diabetes increases advanced glycation end products on cardiac ryanodine receptors/calcium-release channels. *Diabetes* 2003;52:1825-36.
64. Hagiwara H, Kaizu K, Uriu K, et al. Expression of type-1 plasminogen activator inhibitor in the kidney of diabetic rat models. *Thromb Res* 2003;111:301-9.
65. Vallejo S, Angulo J, Peiro C, et al. Prevention of endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by gliclazide treatment. *J Diabetes Complicat* 2000;14:224-33.
66. Kedziora KZ, Luciok M. Effect of aminoguanidine on the generation of superoxide anion and nitric oxide by peripheral blood granulocytes of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin. Chim Acta* 1998;278:45-73.
67. Sheader E, Benson R, Best L, Cytotoxic action of methylglyoxal on insulin-secreting cells. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1381-6.
68. Shangari N, Bruce WR, Poon R, O'Brien PJ. Toxicity of glyoxals-role of oxidative stress, metabolic detoxification and thiamine deficiency. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1390-3.
69. Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwergold SB. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999;48:198-202.
70. Park YS, Koh YH, Takahashi M, et al. Identification of the binding site of methylglyoxal on glutathione peroxidase: methylglyoxal inhibits glutathione peroxidase activity via binding to glutathione binding sites arg 184 and 185. *Free Radic Res* 2003;37:205-11.
71. Nemet I, Turk Z, Dunjakd L, Car N, Defterdoravic LV. Humoral methylglyoxal level reflects glycemic fluctuation. *Clin Biochem* 2005;38:379-83.

72. Phillips SA, Mirrlees D, Thornalley PJ. Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats. Effect of the aldose reductase inhibitor statil. *Biochem Pharmacol* 1993;46:805-11.
73. Ohmori S, Mori M, Kawase M, Tsuboi S. Determination of methylglyoxal as 2-methylquinoxaline by high-performance liquid chromatography and its application to biological samples. *J Chromatogr* 1987;414:149-55.
74. Anwar MM, Meki AR. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003;135:539-47.
75. Shamsi FA, Sharkey E, Creighton D, Nagaraj RH. Maillard reactions in lens proteins: methylglyoxal-mediated modifications in the rat lens. *Exp Eye Res* 2000;70:369-80.
76. Limaye PV, Sivakami S. Evaluation of the fluidity and functionality of the renal cortical brush border membrane in experimental diabetes in rats. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;1497:1-7.
77. Kondoh Y, Kawase M, Kawakami Y, Ohmori S. Concentrations of D-lactate and its related metabolic intermediates in liver, blood, and muscle of diabetic and starved rats. *Res Exp Med (Berl)* 1992;192:407-14.
78. Raju J, Gupta D, Rao AR, Baquer NZ. Effect of antidiabetic compounds on glyoxalase I activity in experimental diabetic rat liver. *Indian J Exp Biol*. 1999 ;37:193-5.
79. Choudhary D, Chandra D, Kale RK. Influence of methylglyoxal on oxidant enzymes and oxidative damage. *Toxicol Lett* 1997;93:141-52.
80. Yim HS, Kang SO, Hah YC, Chock PB, Yim MB. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. *J Biol Chem* 1995;270:28228-33.
81. Amicarelli F, Colafarina S, Cattani F, Cimini A, Di Ilio C, et al. Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free Radic Biol Med* 2003;35:856-71.
82. Abdel-Wahab MH, Abd-Allah AR. Possible protective effect of melatonin and/or desferrioxamine against streptozotocin-induced hyperglycaemia in mice. *Pharmacol Res*. 2000;41:533-7.


83. Görgün FM, Kököğlu E, Gümüştaş MK, Altuğ T, Cansever S, Kavunoğlu G. Effects of melatonin on plasma S-nitrosoglutathione and glutathione in streptozotocin-treated rats. *J Toxicol Environ Health* 2004;67:979-86.
84. Faure P, Troncy L, Lecomte M, et al. Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. *Diabetes Metab* 2005;31:169-77.
85. Dursun E, Timur M, Dursun B, Süleymanlar G, Özben T. Protein oxidation in type 2 diabetic patients on hemodialysis. *J Diabetes Complicat* 2005;19:142-6.
86. Argirova M, Breipohl W. Comparison between modifications of lens proteins resulted from glycation with methylglyoxal, glyoxal, ascorbic acid, and fructose. *J Biochem Mol Toxicol* 2002;16:140-5.
87. Hipkiss AR, Bownson C, Carrier MJ. Carnosine, the anti-aging, antioxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech Ageing Dev* 2001;122:1431-45.
88. Gallan MP., Carrascosa, A., Gussinye M., Dominguez, C., Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1563-74.
89. Konukoğlu D, Kemerli GD, Sabuncu T, Hatemi HH. Protein carbonyl content in erythrocyte membranes in Type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 2002;34:367-70.
90. Cederberg J. Oxidative stress, antioxidative defence and outcome of gestation in experimental diabetic pregnancy Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy (Faculty of Medicine) in Medical Cell Biology. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1008. 2001, 66 pp. Uppsala ISBN 91-554-4960-3

EK TABLO 2	Parametreler									
	HbA1c	Plazma PCC (µmol/L.)	Plazma PCC (nmol/mg prot)	Plazma Tiyol (nmol/mg prot)	Plazma Tiyol (µmol/L.)	Doku PCC (nmol/mg prot)	Doku Tiyol (nmol/mg prot)	Doku MGO (µmol/mg prot)	Doku GLO1 (Ü/mg protein)	Doku GLO2
K1	1,65	3,55	0,66	2,27	218,90	2,27	56,02	1,236	0,0531	0,076
K2	1,70	2,77	0,52	1,45	159,34	1,48	54,10	0,950	0,0463	0,068
K3	1,37	2,36	0,49	2,64	146,47	1,37	54,98	1,473	0,0591	0,024
K4	1,65	2,23	0,41	1,69	159,34	1,61	57,51	1,283	0,0352	0,033
K5	1,62	2,36	0,47	2,53	185,10	1,49	78,10	1,283	0,0579	0,049
K6	1,62	2,77	0,59	3,52	333,17	2,57	64,97	1,616	0,0321	0,057
K7	1,61	2,95	0,58	4,33	352,49	1,80	63,60	1,901	0,0458	0,064
K8	1,67	2,41	0,49	2,58	180,27	0,83	101,79	1,236	0,0427	0,064
K9	1,69	3,27	0,68	2,09	210,85	1,60	82,80	1,664	0,0580	0,055
K10	1,75	2,64	0,54	2,50	201,19	1,01	88,05	1,473	0,0662	0,028
M1	1,80	1,64	0,35	3,09	402,38	1,12	57,36	1,711	0,0372	0,062
M2	1,49	2,59	0,45	3,25	247,87	1,04	92,90	1,473	0,0614	0,026
M3	1,51	2,91	0,51	1,89	186,71	1,96	69,74	1,569	0,0662	0,044
M4	1,62	2,73	0,52	2,74	243,04	1,86	62,34	0,998	0,0412	0,084
M5	1,42	2,45	0,48	2,04	159,34	1,87	56,34	1,283	0,0909	0,075
M6	1,51	2,77	0,55	3,03	169,00	1,01	51,61	1,331	0,1459	0,035
M7	1,47	2,27	0,42	3,01	239,82	1,52	71,18	1,854	0,0351	0,037
M8	1,37	3,18	0,67	2,18	167,39	1,64	45,47	1,093	0,0215	0,046
M9	1,54	3,59	0,72	2,17	210,85	1,78	85,09	1,236	0,0542	0,059
M10	1,54	3,64	0,81	3,23	223,72	2,03	38,24	1,901	0,0422	0,045
S1	3,05	3,36	0,60	1,50	141,64	4,54	26,21	3,993	0,0421	0,035
S2	3,32	3,05	0,70	1,60	186,71	4,25	50,43	3,138	0,0207	0,014
S3	4,86	3,59	0,62	1,46	109,45	1,96	45,11	2,710	0,0213	0,017
S4	3,98	3,23	0,51	1,13	114,28	3,01	38,61	2,710	0,0347	0,022
S5	3,87	3,64	0,79	1,94	140,03	2,81	44,73	3,518	0,0239	0,016
S6	4,15	3,59	0,61	2,70	246,26	2,30	31,01	3,470	0,0229	0,037
S7	4,03	3,23	0,59	1,77	186,71	2,72	45,01	3,138	0,0318	0,023
S8	3,50	3,77	0,66	1,78	209,24	2,71	35,15	3,470	0,0302	0,019
S9	3,83	4,23	0,91	1,84	178,66	3,42	34,00	3,898	0,0332	0,028
S10	4,10	4,59	1,35	1,53	140,03	2,39	41,00	3,375	0,0495	0,029
SM1	3,96	2,05	0,49	2,60	297,76	1,29	51,66	1,996	0,0295	0,083
SM2	3,23	2,32	0,37	1,98	189,92	2,23	53,77	2,234	0,0230	0,028
SM3	3,64	1,17	0,32	2,33	228,55	1,98	67,01	1,806	0,0693	0,044
SM4	3,56	3,18	0,91	1,68	165,78	1,69	61,34	2,234	0,0430	0,033
SM5	3,81	2,45	0,48	2,03	222,11	2,18	68,67	2,329	0,0681	0,046
SM6	3,75	3,00	0,57	2,41	259,13	1,33	48,61	2,282	0,0715	0,050
SM7	3,63	3,27	0,66	1,88	194,75	1,19	59,15	2,472	0,0569	0,059
SM8	3,69	3,00	0,59	1,45	144,86	1,39	60,30	2,044	0,0255	0,058
SM9	3,78	1,59	0,29	1,46	199,38	1,25	62,99	2,09	0,0887	0,081
SM10	3,59	2,09	0,37	1,63	167,39	1,59	50,67	1,569	0,0601	0,064

TC.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Araştırma Görevlisi Dr. Meltem DEMİR'e ait "Streptozotosin diyabeti oluşturulan ratlarda protein oksidasyonunun değerlendirilmesi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 24/06/2005
İmza

Prof. Dr. K. Muzaffer ÜSTDAL Başkan..........İmza

Prof. Dr. Selim KURTOĞLU..........İmza

Prof. Dr. Fahri BAYRAM.....İmza

Prof. Dr. Kader Köse (Danışman)..........İmza

Yrd. Doç. Dr. Cevat YAZICI.....İmza